

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Papp Zoltán

**Gyulladásos fülbetegségek patomechanizmusának és
gyógyítási lehetőségeinek vizsgálata**

DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Gyulladásos fülbetegségek patomechanizmusának és
gyógyítási lehetőségeinek vizsgálata**

Dr. Papp Zoltán

Témavezető: Dr. Szilvássy Judit



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalom

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. <i>Otitis externa</i> áttekintése	3
2.1.1. Patofiziológia	3
2.1.2. Mikrobiológia	4
2.1.3. Diagnózis	5
2.1.4. Terápia	5
2.1.5. <i>Candida auris</i>	7
2.2. Az <i>otitis media</i> áttekintése.....	8
2.2.1. <i>Otitis media acuta</i>	9
2.2.2. <i>Otitis media effusio</i> val	10
2.3. A MALDI-TOF.....	11
2.3.1. A MALDI-TOF és a mikrobák	12
3. Célkitűzés	14
4. Anyagok és módszerek	15
4.1. <i>OME</i> vizsgálata	15
4.1.1. Betegcsoport	15
4.1.2. Mintagyűjtés és elemzés	15
4.1.3. MALDI-TOF MS módszer alkalmazása	16
4.2. <i>C. auris</i> vizsgálati anyagai és módszerei	17
4.2.1. Izolátumok	17
4.2.2. Minimális gátló koncentráció.....	18
4.2.3. Minimális fungicid koncentráció	18
4.2.4. Idő-ölés görbék	19
4.2.5. Széles látószögű fluoreszcens mikroszkópia.....	19
5. Eredmények	21
5.1. Középfüli váladékminták analízise.....	21
5.2. <i>Candida auris</i> -szal végzett vizsgálatok eredményei.....	23
5.2.1. MIC meghatározása mikro-leveshígítással és E-teszt módszerekkel.....	23
5.2.2. Minimális fungicid koncentrációk	24
5.2.3. Idő-ölés kísérletek eredményei	25
5.2.4. Széles látószögű fluoreszcens mikroszkópia.....	29
6. Megbeszélés	31
6.1. <i>Betegcsoport</i> analízis megbeszélése	31
6.2. <i>Candida auris</i>	32
7. Összefoglalás	35
8. Summary	36

9. Rövidítések jegyzéke.....	37
10. Irodalomjegyzék	38
<i>10.1. Hivatkozott közlemények.....</i>	<i>38</i>
<i>10.2. Saját közlemények.....</i>	<i>43</i>
11. Tárgyszavak.....	44
12. Köszönetnyilvánítás	45
13. Függelék.....	46

1. Bevezetés

A fül gyulladással megbetegedései a gyakori kórképek közé sorolhatók. Kutatásunk fókuszába a külső- és középfül gyulladással folyamatait helyeztük. Munkánk során két klinikai entitást, az OME-t (otitis media with effusion) és a hallójárat gyulladással fontos szerepet játszó *Candida auris* amphotericin B (AMB) iránti *in vitro* érzékenységét vizsgáltuk.

Az OME a középfül olyan kóros állapota, amelyet folyadékgyülem jellemez, miközben akut gyulladás jelei és tünetei nem figyelhetők meg (Rosenfeld és mtsai., 2004). Az OME előfordulása az élet első hat évében eléri a 90% -ot (Tos és mtsai., 1972, 1979). Az OME-t kísérő tartós vezetéssel halláskárosodás következtében romlik a beszéd- és szociális készségek fejlődése és az életminőség. Az OME-ben szenvedő betegek ellátásának pénzügyi terhei szintén jelentősek (Shekelle és mtsai., 2002). Azoknál a betegeknél, akiknél a MEE (middle ear effusion) hosszabb ideig fennáll, a betegség jelentős halláskárosodást vagy szerkezeti változásokat okoz a középfülben. A különböző esetek patofiziológiája közötti különbségek még mindig nem teljesen tisztázottak, azonban a baktériumok jelenléte feltételezhetően fontos szerepet játszik a folyamatban. A MALDI-TOF MS bevezetésre került a rutin mikrobiológiai diagnosztikába, ami lehetővé tette a klinikai minták, például az MEE vizsgálatát több ezer baktériumra egyidejűleg, nagy érzékenységgel. Munkánk egyik részének célja az volt, hogy bizonyítsa a koncepciót a MALDI-TOF MS alkalmazhatóságára a gyermekkorban leggyakrabban hallásromláshoz vezető perzisztens MEE baktériumtartalmának meghatározásában, valamint betekintést nyújtson a baktériumflóra spektrumába OME-ben szenvedő gyermekek esetében.

Munkánk másik fókuszában az újonnan megjelent *C. auris* által okozott fertőzések, illetve a kórokozó ismert gombaellenes szerekekkel szembeni érzékenységének vizsgálata állt. A *Candida auris* egy világszerte megjelenő opportunistá élesztőgomba, amely nemcsak felületi, hanem életveszélyes szervi és szisztémás fertőzéseket okoz a kritikus állapotú betegek körében (Osei 2018., Lockhart és mtsai., 2017). A *C. auris* mind *in vitro*, mind *in vivo* képes nagy aggregátumok létrehozására, ami összefüggésbe hozható kiváló túlélési képességével különböző környezeti körülmények között, beleértve a gombaellenes szerekek jelenlétét is (Kovács és mtsai., 2021). A flukonazol és kisebb mértékben az új triazolok (pl. pozakonazol, izavukonazol) MIC-értékei gyakran magasak (Escandon és mtsai., 2019, Chowdhary és mtsai., 2020, Montoya és mtsai., 2019). Jelenleg az echinocandinok (anidulafungin, kaszopofungin és mikafungin) az ajánlott gyógyszerek az invazív *C. auris* fertőzés kezelésére két hónapos és idősebb betegeknél (CDC, 2023). Mindemellett azoknál a betegeknél, akik nem reagálnak az

echinocandin-terápiára kezdeti kezelésként liposzómás vagy hagyományos AMB-re való áttérés javasolt. Ráadásul az echinocandinok rosszul hatolnak be a központi idegrendszerbe, a szembe vagy a húgyutakba, így agyhártyagyulladás, endophthalmitis és húgyúti fertőzések esetén még mindig az AMB az első terápia választás (Carolus és mtsai., 2020).

Eddig csak limitáltan álltak rendelkezésre adatok az AMB *in vitro* ölési aktivitásáról a különböző *C. auris* kládok ellen, ezért meghatároztuk az AMB ölési aktivitását a négy legelterjedtebb kládba tartozó *C. auris* izolátumokkal szemben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Otitis externa áttekintése

Az otitis externa az emberek 10%-át érinti élete során. Időbeni lefolyása alapján akut vagy krónikus, lokalizációja és kiterjedése alapján diffúz vagy körülírt formában jelentkezhet. A külsőfül gyulladásának hátterében gyakran fordul elő olyan körülmény, ami a külső hallójárat bőrének integritását kikezdi. A rendszeres úszás, párás környezeti körülmények, szűk hallójárat anatómiai viszonyok, a hallójárat bőr ekcémája, hallókészülék használat és mechanikai sérülések a betegség kialakulásának esélyét növelik. Különösen érintett populáció az immundeprimált, illetve a diabéteszes betegek csoportja (Hajioff és Mackeith, 2008).

2.1.1. Patofiziológia

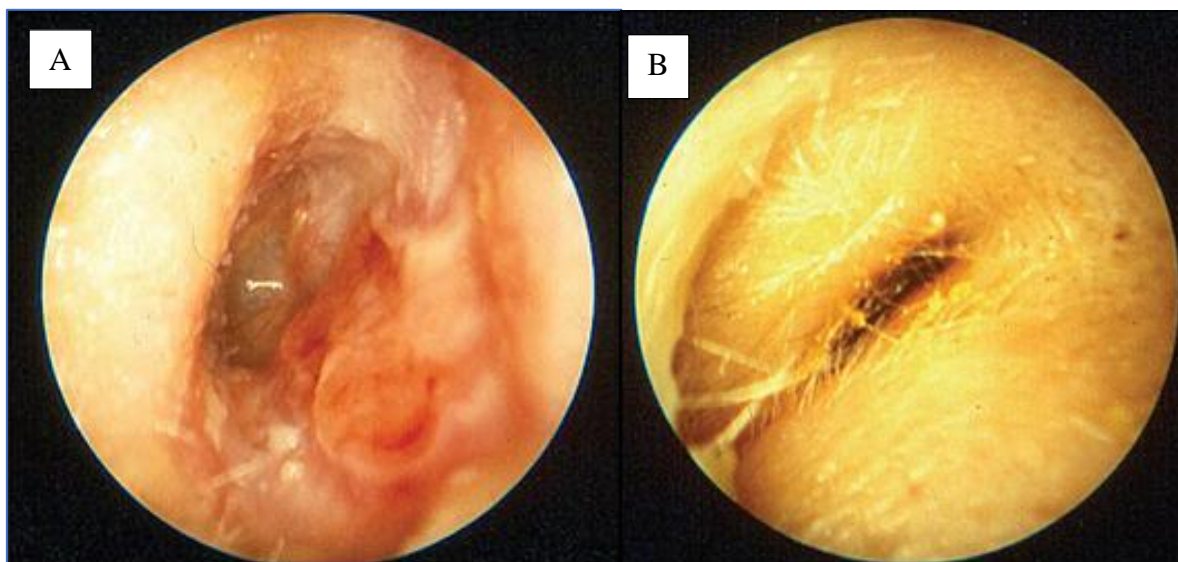
A hallójárat bőrrel bélelt, kb. 2,5 cm-es cső, melyet a medialis oldalon a dobhártya zár le. A lateralis 1/3-a porcos, melynek hámfájában faggyú és cerumentermelő mirigyek, valamint szőrtüszők találhatóak. A hallójárat mediális kétharmada csontos támasztékkal rendelkezik, és az igen vékony bőr alatt csak jelzetten található meg kötőszövet, így csaknem közvetlenül a csonthártyára fekszik. A mirigyek vékony cerumenréteget termelnek, amely védelmet nyújt mérsékelten antimikrobiális lizozim tartalma révén. A cerumen pH-értéke 6,9, ami szintén gátolja a mikrobiális növekedést. A cerumen elégtelen termelése hajlamosít a fertőzésekre. A hallójárat öntisztulása a lateralis epithelialis migratioval valósul meg, de ez a folyamat az öregedéssel csökken (Beers és Abramo, 2004).

2.1.2. Mikrobiológia

A 19. század jelentős előrelépést hozott az orvostudományban, beleértve a fülészeti szakterület fejlődését. Az otoszkóp Hermann von Helmholtz általi kifejlesztése az 1800-as években jelentős fejlemény volt, amely lehetővé tette a hallójárat és a dobhártya részletesebb vizsgálatát. Az otitis externa először 1844-ben került leírásra Mayer által. Akkor még csak gombafertőzéshez kötötték a megbetegedést egészen a második világháborúig, amikor sok amerikai katona szenvedett hallójárat gyulladásban, és a nagy prevalencia miatt újból górcső alá vették a megbetegedést (Martinez Devesa és mtsai., 2003). Az egészséges fül normál flórájában megtalálhatjuk a *S. epidermidis*, a különböző *Corynebacterium* és alfa-hemolizáló *Streptococcus* fajokat. Huzamosan nedvességnek kitett hallójárat vagy trauma esetén a hallójárat normál flórája is okozhat otitis externát. Az otitis externa esetek több mint 90%-át baktériumok okozzák, leggyakrabban a *Pseudomonas aeruginosa* (22-62%) és a *Staphylococcus aureus* (11-34%). Gyakori a polimikróbás fertőzés. A gombák az akut otitis externa ritkább okai (10%) és inkább a krónikus formákban fordulnak elő. Jellemző kórokozók az *Aspergillus* (60–90%) és a *Candida* fajok (10–40%). A gombás otitis externa hajlamosító tényezői közé tartozik a hosszú távú antibiotikum-használat, az immunszuppresszió és a cukorbetegség (Wiegand és mtsai., 2019). Gyermekpopulációban a hallójárat gombás megbetegedése előfordulása ritkább. A izolátumok mindössze 2%-ában találtak *Aspergillus*, valamint *Candida* fajokat (Beers és Abramo, 2004). A herpeszvírus és a varicella zoster vírus szintén okozhat otitis externát.

2.1.3 Diagnózis

Az otitis externa acuta prodromális szakasza általában néhány naptól egy hétig tart. Kezdetben csekély mennyiségű, szagtalan váladék jellemzi, valamint enyhe viszketés, amihez mérsékelt bőrpír társul. A betegség további progressziója során az erythema fokozódik, és ödéma társul hozzá, serosus majd seropurulens váladék jelenik meg, és tragus nyomásérzékennyé válik. A súlyos otitis externa acuta esetében a hallójárat csaknem teljesen elzáródik (1. ábra), és a halláscsökkenés is megjelenhet panaszként (Agius és mtsai., 1992) . A diagnózis felállításához szükséges a körelőzmény, a fizikális státusz megítélése, illetve a pontos terápia meghatározásához mikrobiológiai tenyésztés.

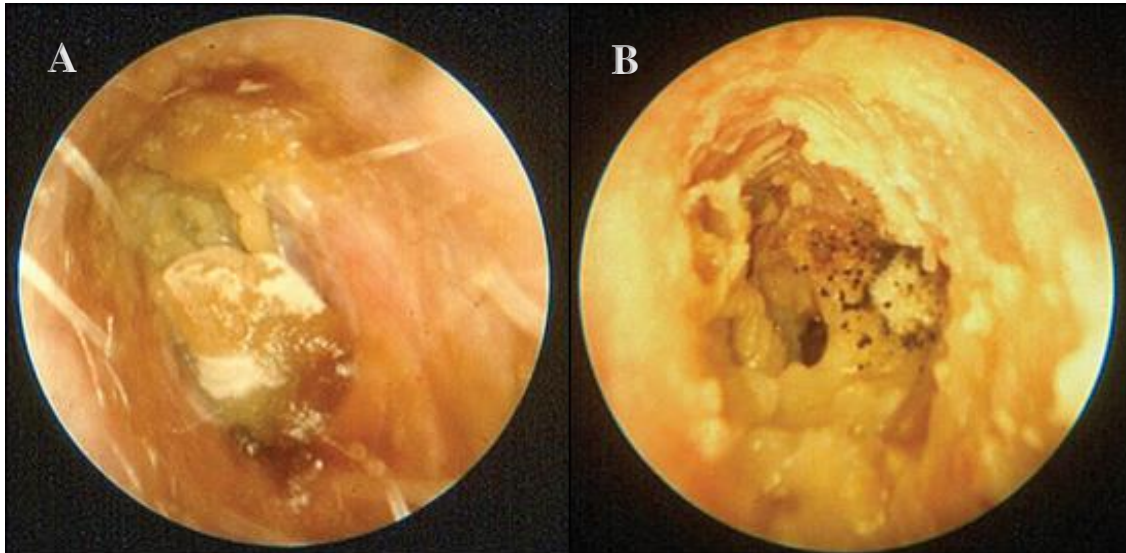


1. ábra. Az akut otitis externa klinikai képe. A. ábra: Otitis externa otoszkópos vizsgálati képe a hallójárat váladék eltávolítását követően. B. ábra: Akut otitis externa otoszkópos vizsgálati képe markáns hallójárat ödémával (Schaefer és Baugh, 2012)

2.1.4 Terápia

A kezelés középpontjában a pH savas irányba történő eltolása és a lehetséges kórokozók elleni antimikrobiális kezelés elsősorban lokális alkalmazása áll. Leggyakrabban ecetsav tartalmú oldatot vagy kenőcsöt alkalmazunk a betegség enyhe, kezdeti formájában, ami elegendő lehet a további progresszió megelőzésére. Huzamos használat vagy egyéni érzékenység esetén a betegek bőrét ez a keverék irritálhatja. Gombás fertőzés gyanúja esetén, az évtizedek alatt felgyülemlett tapasztalatok alapján Castellani oldatos ecsetelés lehet a megfelelő kezelési lehetőség. Napjainkban az otitis externa olyan eseteiben, amikor a hallójárat még nincs teljes mértékben beszűkülve és bakteriális fertőzést gyanítunk a háttérben fülcseppet

(ciprofloxacin + fluocinolon-acetonid) alkalmazunk. Beszűkült hallójárat esetén gézcsíkkal érdemes a hallójáratba juttatni a terápiás szereket. A gézcsíkot 1-2 naponta szükséges cserélni (Schaefer és Baugh, 2012). Az akut otitis externák 10%-a gombás eredetű. Az ilyen fertőzések az antibakteriális kezelésre nem, vagy csak mérsékelten reagálnak. A nem szövődményes gombás fertőzések általában fehéres gyapotszerű szálakkal (pl. *Candida*) jelentkeznek, a szálak mellett kis fekete vagy fehér gömböcskék figyelhetők meg otomikroszkópos vizsgálat során pl. *Aspergillus* fertőzés esetén. Az otitis externa dobhártya-erythemát okozhat, ami a középfülgyulladás tünete is lehet. Pneumatikus otoscopia vagy tympanometria segítségével megkülönböztethető a két kórkép egymástól. Középfülgyulladásban a dobhártya mobilitása korlátozott vagy megszűnik. Az otomycosis klasszikusan viszketéssel, bőséges törmelékes hallójáratival váladékkal, valamint a lokális antibakteriális szerek hatásának elmaradásával jár. Az otomycosis néha azonosítható otoszkópia során (2. ábra) (Schaefer és Baugh, 2012). Nem patogén szaprofita gombák is okozhatnak hallójáratgyulladást. *Candida* által okozott fülgyulladás (2.A ábra). Megfigyelhetők a jellegzetes fehér gombás elemek a törmelékben. *Aspergillus* által okozott fülgyulladás esetén a törmelékben a jellegzetes szürke-fekete gombás elemek láthatók (2. B. ábra). Gyakoriak a kevert bakteriális és gombás fertőzések bakteriális akut hallójáratgyulladás nem megfelelő kezelése esetén. A legtöbb gombás fertőzés enyhe és kezelhető a már fentebb említett oldatokkal, de amennyiben ez nem elegendő tolnaftát vagy klotrimazol alkalmazása is szükséges lehet.



2. ábra: Gomba által okozott otitis externa megjelenési formái. *Candida* által okozott fülgyulladás (A). *Aspergillus* által okozott fülgyulladás (B).

2.1.5 *Candida auris*

A *Candida auris*-t, új fajként leírva 2009-ben, egy 70 éves Japán nőbeteg külső fül váladékából izolálták (Sato és mtsai., 2009). A *C. auris* egy egyre gyakrabban izolálható multirezisztens élesztőgomba, amellyel szemben bizonyos klinikai helyzetekben, mint meningitis, endophthalmitis és húgyúti fertőzések esetén még mindig az AMB az első terápia választás. A *C. auris* mint opportunista kórokozó világszerte izolálható, amely kolonizálhatja a bőrt és a nyálkahártyát, illetve kritikus állapotú betegeknél életet veszélyeztető fertőzéseket okozhat (Borman és mtsai., 2016; Szekely és mtsai., 2019; Forgács és mtsai., 2020; Kovács és mtsai., 2021). Teljes genom szekvenálással hat filogenetikailag elkülönülő kládot (dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai, dél-amerikai, iráni és szingapúri) azonosítottak, jelentős genetikai különbségekkel a kládok között (Lockhart és mtsai., 2017; Chow és mtsai., 2019; Suphavilai és mtsai., 2024). A *C. auris* a WHO által a közelmúltban közölt lista alapján napjaink elsődleges fontosságú kórokozójának számít a *C. albicans*, a *C. neoformans* és az *A. fumigatus* mellett (WHO, 2022).

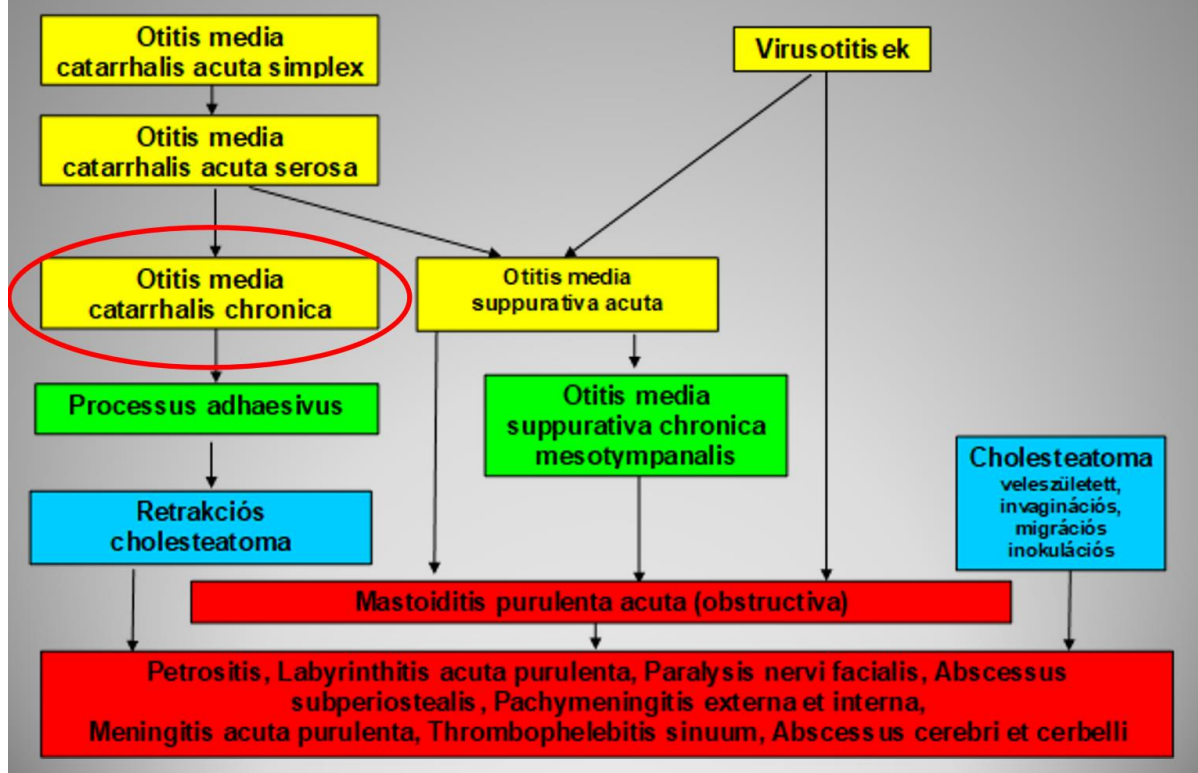
Korábbi tanulmányok *Galleria mellonella* és neutropéniás egérmodellekben kimutatták, hogy a *C. auris* kládok virulenciájukban különböznek egymástól. A *C. auris* *in vitro* és *in vivo* is képes nagy aggregátumokat képezni; a dél-afrikai kládroz tartozó izolátumok 84%-ka fiziológiás oldatban spontán nagy aggregátumokat képez és *Galleria mellonella* modellben kevésbé virulens mint a nem aggregáló dél-kelet ázsiai izolátumok (Borman és mtsai., 2016;

Szekely és mtsai., 2019; Forgács és mtsai., 2020; Kovács és mtsai., 2021). *In vitro* adatok alapján az USA-ban izolált törzsek 90%-ka rezisztens FLU, 30%-ka AMB és 0,5%-ka az echinocandinok iránt (CDC, 2023).

2.2. Az otitis media áttekintése

A középfülgyulladások a leggyakoribb fül-orr-gégészeti kórképek közé tartoznak. Fennállásuk időtartama és kórlefolysuk alapján két nagy csoportjuk az akut és a krónikus formák különíthetők el. Az akut középfülgyulladások gyakran visszatérővé válhatnak, vagy krónikus gyulladásba mehetnek át. A gyulladások több, a tünetek alapján jól elkülöníthető stádiumon át zajlanak. A stádiumokat a szakirodalom saját elnevezéssel illeti. A resolutio bármely stádiumban bekövetkezhet. Ezt az etiológia, a beteg általános és immunológiai állapota, valamint az alkalmazott terápia befolyásolja. Prognózis szempontjából a kimenetel másik lehetséges iránya a krónikus formába történő átmenet. A krónikus középfülgyulladásokat két fő csoportra osztja a szakirodalom. Ezek a gyulladós folyamatok lefolysuk során szintén stádiumokon át fejlődnek és az akut gyulladásoknál említett tényezők által befolyásolva állnak meg az egyes stádiumokban vagy érik el a végső állapotot egyikét a krónikus mesotympanalis, vagy a krónikus cholesteatomás otitis mediát. Amennyiben az akut vagy krónikus gyulladós folyamat a szervezet védekezőképességének hiánya, anatómiai vagy genetikai hajlam vagy a kezelés elégtelensége vagy ezek kombinációja miatt túllép a középfül határain, szövődményes középfülgyulladás alakulhat ki. A szövődmények, maradhatnak a koponyaűrön kívül, ilyenkor extrakraniális szövődményről beszélünk. A koponyaűrbe terjedő gyulladásokat intrakraniális szövődménynek nevezzük (3. ábra). Kutatásunk során olyan betegeket vizsgáltunk, akiknél a krónikus gyulladás lefolysa során a folyamat megáll a krónikus serosus otitis media állapotánál. Ezt az állapotot a szakirodalom krónikus serosus otitis media (cSOM) névvel illeti, de megtalálható más elnevezése is, mint a glue ear vagy az otitis media with effusion (OME). Ezen kórállapot kerül itt részletesen leírásra, de a megértéshez szükséges az otitis media acuta ismerete is.

Az otitisek kialakulásának folyamata



3. ábra Az otitisek kialakulásának folyamata és egymáshoz való viszonyuk (klinikai szemléletű csoportosítás). Sárga: akut középfüli gyulladásos folyamatok, zöld: krónikus középfüli gyulladásos folyamatok cholesteatoma nélkül, kék: krónikus középfüli gyulladásos folyamatok koleszteatoma kialakulásával, piros: középfüli gyulladások szövődményes esetei (Forrás: A szerző saját szerkesztése)

2.2.1. Otitis media acuta

Az otitis media acuta catarrhalis formában kezdődik. Ilyenkor a középfülben serosus váladék halmozódik fel, ami könnyen felülfertőződik patogén baktériumokkal és átalakul otitis media suppurativa acutává, aminek az otoscopos képe a 4. ábrán látható. A diagnosztikája egy részről a tüneteken alapul: fülfájdalom, halláscsökkenés, fülfolyás, láz. A dobhártya státusz megítélése a másik része diagnózis felállításának: hyperaemiás, kidomborodó dobhártya, előrehaladottabb esetben akár perforációval, melyen keresztül genny ürülhet. Tünetként a középfüli folyadékgyülem jelenléte miatt megjelenik a halláscsökkenés.



4. ábra: Otitis media otoscopos képe. Számos megjelenési formája van a dobhártyának középfülgyulladás esetében annak függvényében, hogy milyen stádiumú. Az ábra a kifejlődött otitis media suppuratívát mutatja. Ez az állapot a spontán perforációhoz közel áll. Forrás:(Lieberthal és mtsai., 2013).

Kezelése, mivel túlnyomórészt bakteriális eredetű, elsősorban az antibiotikus terápia. Kezdetekben, az antibiotikus hatás kifejlődéséig a fájdalmat a kezelés nem csökkenti, így az otalgia kezelésére fájdalomcsillapító használata is javallott (Burke és mtsai., 1991).

2.2.2. Otitis media effusioval

Az otitis media effusioval (OME) a középfüli folyadékgyülem (MEE) gyulladásos jelek megléte nélkül (Rosenfeld és mtsai., 2004). Ez az állapot akkor alakul ki, ha az acut folyamat resolúciója nem teljes és a fülkürt nem tudja ellátni sem a középfül üregrendszerének szellőzését (ventillációját), sem a folyamatos tisztulását (clearance-ét).

A kórkép incidenciája az első 6 életévben eléri a 90%-ot, hat hónapos és 4 éves kor közötti csúccsal. Az OME incidenciája magasabb az alacsonyabb szocioökonómiai státuszban lévő gyermekek esetében. A betegség a középfüli folyadékgyülem miatt halláscsökkenéssel jár, ez a tünet a betegek 5-10%-ban perzisztál, és a következményeként kialakuló halláscsökkenés miatt beszédfejlődési rendellenességekhez is vezethet. Mivel a kórkép sok gyermeket érint, gazdaságilag is jelentős terhet ró az országokra. Az USA-ban évenként nagyjából 2,2 millió kórházi megjelenés történik OME miatt, melynek az anyagi vonzata 4 milliárd dollár (Shekelle és mtsai., 2002).

Etiológiájában a felső légúti hurutos megbetegedések a fülkürt elzáródása miatt fontosak, hiszen így a dobüreg szellőzése csökken. Ezt követően a gyulladásos sejtek aktiválódása váltja ki a középfüli nyálkahártya ereinek permabilitás fokozódását.

Gyermekekben a Waldeyer gyűrű alkotóinak a mérete a garat méreteihez képest arányaiban véve nagyobb, mint felnőttekben, így az adenoid kis mértékű megnagyobbodása is a fülkürt elzáródásához vezet (Shekelle és mtsai., 2002).

A betegség diagnózisának felállítása otoscopos vizsgálattal és tympanometria elvégzésével lehetséges. Az otoscopos lelet általában olyan dobhártyát mutat, ahol a megtartott transzparenciájú dobhártya mögött szalmasárga színű folyadékgyülem látható, esetenként még légbuborékok is megfigyelhetők benne. Pneumatikus otoscoppal a dobhártya mobilitásának csökkenése is megfigyelhető. A középfüli folyadékgyülemet tympanometria esetében a B-típusú „lapos” görbe jelzi.

A betegség diagnózisának felállítása egy 6 hónapos megfigyeléssel kezdődik, ez idő alatt a betegek 50-60%-a spontán gyógyul (Stool és mtsai., 1994). Amennyiben a spontán gyógyulás nem következik be, a megfelelő kezelés felállításához figyelembe kell venni: a beteg korát, a társbetegségeket, a halláskárosodás mértékét, a kór állapot fennállásának idejét és dokumentálni kell a kórkép oldalosságát. Magyarországon amennyiben nincs spontán gyógyulás, adenotomiát végzünk, ezt követően 6 héttel kontroll hallásvizsgálat során mérhetjük fel a dobüreg állapotát. Ha a dobüreg állapota továbbra sem megfelelő, ventilációs tubus beültetése javasolt. Az adenotomia abban az esetben szükséges, ha a folyadékgyülemet a megnagyobbodott adenoid okozza az Eustach kürt nyílásának elzárásával. A ventilációs tubus abban az esetben szükséges, ha a dobüreg szellőzését az adenoid eltávolítása nem oldja meg. Egy metaanalízis szerint az adenotomia hatásosabb, mint a ventilációs tubus beültetés (Teschner, 1996).

2.3. A MALDI-TOF

A MALDI-TOF MS eljárás fő profilja a baktériumok és gombák gyors identifikálása. Ez egy olyan módszer, melyben a mintában lévő molekulák szétválogatása és tömegük szerinti azonosítása a cél. A kezdeti lépés a molekulák ionizációja, majd tömegspektrometriás módszerrel történő szeparációja és azonosítása. Ez egy olyan kémiai analitikai módszer, ahol a MALDI ionforráshoz TOF (time of flight) detektor csatlakozik.

MALDI-TOF MS talán az egyike a hagyományos proteomikai módszereknek, amelyet nagy mennyiségű peptid-tömeg esetén alkalmazhatnak, ekkor ugyanis nagyobb az esély a homológ szekvenciák által biztosított lefedések elérésére genetikai szempontból.

A lágy ionizációs technika, a mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós ionizáció (MALDI) kifejlesztése lehetővé tette nagy biomolekulák, például ép fehérjék elemzését (Teschner, 1996). Tömegspektrometriás (MS) analízissel teljes baktériumsejtekből „ujjlenyomatokat” lehet venni

(Teschner, 1996). Így a MALDI-TOF MS eljárás gyors, pontos és érzékeny eszközzé vált a baktériumok, gombák és vírusok mikrobiális jellemzésére és azonosítására.

A MALDI-TOF MS módszer előnyei közé tartozik a lágy ionizációs technika, amely lehetővé teszi nagy, nem illékony biomolekulák, például ép fehérjék ionizálását és elpárologtatását (Ryzhov és Fenselau, 2001). Minden MALDI-TOF MS rendszer 3 fő egységből áll. Az első a LASER ionizáló forrás, mely lehetővé teszi az ionizációt, és a mintamolekula ionjait gázfázisba viszi át. A második a tömeganalizátor lehetővé teszi az ionok szétválasztását a tömeg/töltés arány szerint, az utolsó egység pedig a leválasztott ionok megfigyelésére szolgáló detektor.

2.3.1. A MALDI-TOF és a mikrobák

A hagyományos mikrobiológiai módszerekkel a középfüli váladék (MEE) jelentős része sterilnek bizonyult korábbi kutatások során. A MALDI-TOF MS megfelelő eszköz a baktériumfajok széles körének precíz és egyidejű azonosítására, kis mennyiségű minta esetén is. A tanulmányunk célja az volt, hogy feltárja a MALDI-TOF MS alkalmazhatóságát a MEE bakteriális flóra összetételének vizsgálatában.

Mivel ez a technika képes nem csak a kis molekulák, hanem nagymolekulájú fehérjék kimutatására is így könnyedén különbséget tudunk tenni rokon fajok között is. Az 1990-es évek végén a módszer teljes baktériumsejtekre történő alkalmazásáról azt gondolták, hogy jellegzetes és reprodukálható spektrumok keletkeznek, amelyek segítségével a baktériumok nemzetség és faj szintjéig azonosíthatók (Borman és mtsai., 2016).

A MALDI-TOF MS alapelve az, hogy a céllemezre lerakott mikrobiális mintákat mátrixoldattal vonják be, amely a mintával kikristályosodik, és lizálja a vegetatív szervezeteket. A nehezen lizálható mikrobák, például bizonyos Gram-pozitív baktériumok, mikobaktériumok, élesztőgombák és penészgombák gyakran további erős szerves savval történő előkezelést vagy mechanikai lízist igényelnek. A műszerbe helyezve, a mintákat rövid lézerimpulzusokkal ionizálják, minimális fragmentációval gázfázisú ionokat képezve („lágy ionizáció”), majd a részecskéket vákuumban elektromos téren keresztül gyorsítják. Az egyes részecskéknek a detektorhoz való eljutásához szükséges idő vagy az úgynevezett „repülési idő” a részecskék tömegétől és töltésétől függ. Miután a tömegspektrométer a mintában minden előforduló fehérjét kimutatott, spektrális ujjlenyomat keletkezik, amely egyedi az analizált szervezetre. Tanulmányok kimutatták, hogy a MALDI-TOF MS által kimutatott domináns fehérjék riboszómális fehérjék, bár más nagy mennyiségben előforduló citoszol fehérjék is kimutathatók

(pl. DNS-kötő fehérjék és hidegsokk-fehérjék) (Lockhart és mtsai., 2017; Chow és mtsai., 2019). A tesztelt értéket ezután automatikusan meghatározzák egy olyan szoftver segítségével, amely összehasonlítja az ismeretlen organizmus spektrális profilját egy referenciaadatbázissal.

A kereskedelemben korábban két MALDI-TOF MS rendszer létezett a mikrobiális azonosításra a Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA) és a bioMérieux VITEK MS (bioMérieux, Durham, NC). Mivel a MALDI-TOF MS által kapott spektrumok általában nem teljesen azonosak az adatbázisban már szereplőkkel, minden egyes egyezéshez egy „pontértéket” (Bruker) vagy „konfidenciaértéket” (bioMérieux) rendelnek a vizsgált szervezet adatai alapján. Mi a kísérleteink során a Bruker MALDI Biotypert használtuk.

3. Célkitűzés

1. A krónikus savós középfülgyulladásban szenvedő betegeknél a vizsgálat célja az volt, hogy bizonyítsa a koncepciót miszerint a MALDI-TOF MS alkalmazható az állandósult középfüli folyadékgyülem baktériumtartalmának meghatározásában.
2. További célunk volt, hogy az új technológia segítségével betekintést nyerjünk az OME-ben szenvedő gyermekek középfüli váladékának baktériumflóra spektrumába.
3. A *Candida auris* által okozott hallójáratgyulladás esetében a kórokozó által okozott gyulladás kezelése jelenti az egyik nehezen leküzdhető problémát. Ennek egyik oka, hogy az alkalmazható terápiás készítmények tekintetében még nem álltak rendelkezésünkre adatok az *in vitro* ölési aktivitásról a különböző *C. auris* kládok ellen. Munkánk során ezért meghatároztuk az amphotericin B ölési aktivitását a négy leggyakoribb kládba tartozó *C. auris* izolátumokkal szemben.

4. Anyagok és módszerek

4.1. OME vizsgálata

4.1.1. Betegcsoport

Prospektív vizsgálatot végeztünk a Debreceni Egyetem Fül-orr-gégészeti és Fejnyaksebészeti Klinikáján krónikus OME miatt kizárólag adenotomián és paracentesisen vagy ventilációs tubus behelyezésen átesett gyermekek középfüli váladék mintáin. A középfüli váladékmintákat 2014 júliusa és 2015 januárja között gyűjtöttük. Összesen 40 beteget (64 középfülből vett mintát) vontunk be a vizsgálatba. A betegcsoport 21 férfiből és 19 nőből állt. A betegek átlagéletkora 4,5 év volt (2-13 év). A krónikus OME klinikai diagnózisát a betegek anamnézise, valamint az otoscopos és tympanometriás leleteknek a műtét előtti értékelése igazolta. A vizsgálati kritériumokba való felvétel feltétele az volt, hogy a műtétet megelőző hat hónapon át, a hagyományos kezelés ellenére, egymást követő B típusú tympanogrammal középfüli folyadékgyülem meglétét lehetett igazolni. Kizárásra kerültek azok a gyermekek, akiknél korábban primer vagy szekunder immunhiányt, cisztás fibrózist, immotilis csillószindrómát, craniofacialis rendellenességet vagy genetikai szindrómát diagnosztizáltak vagy felmerült ezek gyanúja. Kontrollként középfülmintát vettünk (fiziológiás sóoldatot használva hígításnak) két cochlearis implantáción átesett gyermek egyébként egészséges középfülből. Minden beteg beleegyezését adta a vizsgálatba való belépés előtt. A tanulmányt az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásaitikai Bizottsága hagyta jóvá (ETT TUKEB 12440-1/2015/EKU), és a Helsinki Nyilatkozat szerint készült.

4.1.2. Mintagyűjtés és elemzés

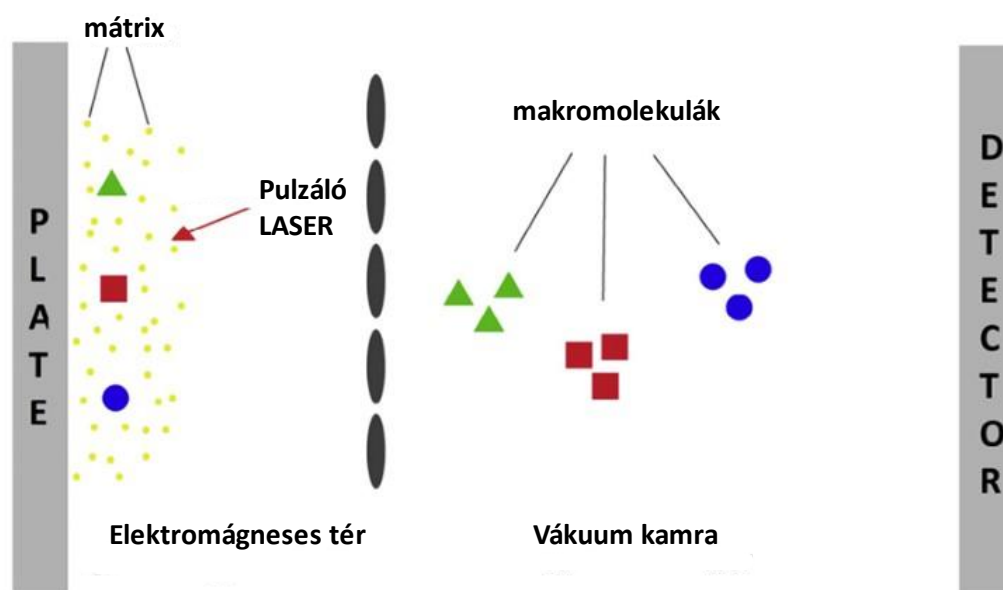
Minden sebészeti beavatkozást intratracheális narkózisban végeztünk. A külső hallójáratokat gondosan 70%-os etanollal fertőtlenítettük, majd paracentézist végeztünk. A középfülből a folyadékot egy steril fém szívócsővel (külső átmérője 0,8 mm) steril fecskendőbe szívtuk ki. A szívócsövet óvatosan kezeltük, hogy távol tartsuk a hallójáratától, elkerülve ezzel az esetleges kontaminációt. A fecskendőből mintákat vettünk, és azonnal Stuart táptalajba helyeztük (Meus S.r.l. Via L. Vinci 24/b, Piove di Sacco, Olaszország). Az összegyűjtött mintákat egy órán belül elküldtük az Orvosi Mikrobiológiai Intézetbe. A mintákat három különböző táptalajon (véragar, csokoládé-agar és eozin-metilénkék agar) tenyésztettük 48 óráig. Minden kolóniát, még a legkisebbeket is faj szerint azonosítottunk. Miután minden telephez mátrixoldatot adtunk, a mintákat MALDI-TOF MS-sel (Microflex, BrukerDaltronics,

Bremen, Németország) elemeztük. Mivel mindegyik baktérium külön spektrumot ad, így pontosan azonosíthatóak voltak a rendelkezésünkre álló adatbázis alapján.

4.1.3. MALDI-TOF MS módszer alkalmazása

A véragaron 37 °C-on, 24-48 óra után nőtt baktérium tenyészetből egyedi telepeket szedtünk fel, és közvetlenül két példányban vittük fel a MALDI céllemezre, a targetre. Mivel a *Haemophilus influenzae* csak csokoládé-agaron növekszik, ezért a csokoládé-agaron nőtt baktériumokat is vizsgáltuk. Miután a lemezt szobahőmérsékleten levegőn szárítottuk, 1 µl mátrixoldatot, azaz 10 mg/ml α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (BrukerDaltonics, Bremen, Németország) 50% (v/v) acetonitril/2,5% (v/v) trifluor-ecetsavat (Sigma-Aldrich) adtunk minden egyes folthoz, és a lemezt ismét levegőn szobahőmérsékleten szárítottuk.

A tömegspektrumokat Microflex Biotyper-rel (Bruker Daltonics) hoztuk létre a gyártó szabványos beállításával. Minden mintánál ujjlenyomatokat vettünk a flexControl 3.0-s verziójú szoftver (Bruker Daltonics) segítségével, amiket 2000 és 20 000 dalton közötti tömegtartományban elemeztük, és összehasonlítottuk a Bruker Daltonics adatbázis legfrissebb verziójával (2015. december). Az integrált szoftver egy eredménylistát generált, amelyben a leghasonlóbb ujjlenyomattal rendelkező fajokat logaritmikus pontszámuk szerint rendezte. Az 1,7 alatti pontszámok megbízhatatlan azonosítást jeleztek; 1,7 és 1,99 között valószínű nemzetségonosítás; és 2,0 vagy annál nagyobb, biztonságos nemzetségonosítást és valószínű vagy nagy valószínűséggel faj azonosítást (2,0 és 2,29 között, illetve legalább 2,3) jeleztek.



5. ábra: MALDI-TOF MS sematikus ábrázolása. Két szürke sáv jelzi a detektort (detector) és a tálcát (plate). A pulzáló lézersugár (pulsating laser) megcélazza a makromolekulákat, melyek zöld, piros és kék színnel vannak jelölve. Forrás: A szerző saját szerkesztése

4.2. *C. auris* vizsgálati anyagai és módszerei

4.2.1. Izolátumok

Ahogy a 3.1.5. résznél említettük a *C. auris* kládok virulenciájukban különböznek egymástól: a négy legelterjedtebb klád izolátumait (dél-ázsiai n=6, kelet-ázsiai n=4, dél-afrikai n=6 és dél-amerikai n=6) az 3. táblázat sorolja fel. A típustörzs az a törzs, amelyet Satoh és munkatársai (2018) először izolálták a 79 éves nőbeteg füléből, a kelet-ázsiai kládba tartozik. Az egyes *C. auris* izolátumok kládszintű besorolásához 28S rRNS és/vagy ITS1 régiókra irányuló szekvenálás történt (Borman és mtsai., 2016; Szekely és mtsai., 2019; Forgács és mtsai., 2020; Kovács és mtsai., 2021). Két nappal a kísérletek előtt az izolátumokat Sabouraud agar táptalajon frissítettük fel, illetve CHROMagar™ Candida (Becton Dickinson) táptalaj segítségével ellenőriztük az izolátumok tisztaságát.

4.2.2. Minimális gátló koncentráció

Az AMB MIC érték meghatározása a standard mikro leves-hígítós módszer (BMD) alapján történt, a CLSI M27-Ed4 dokumentum szerint RPMI-1640-ben tesztközegben (Sigma, Budapest, Magyarország), $\sim 10^3$ CFU/mL kiindulási csíraszámmal (CLSI, 2017). Az AMB-t (Sigma, Budapest, Magyarország) 100%-os dimetil-szulfoxidban oldottuk fel és a további hígításokat RPMI-1640-ben végeztük. Definíció szerint a MIC a gyógyszer azon legkisebb koncentrációja, amely a kórokozó szaporodását már gátolja a kontrollhoz képest. A MIC értékeket 24 órás, 35 °C-on történő inkubáció után, vizuálisan határoztuk meg a teljes gátlási kritérium alkalmazásával (CLSI, 2017).

A MIC értékeket egy alternatív vizsgálati módszer, az E-teszt módszerrel is meghatároztuk (AB BIODISK, Solna, Sweden) a gyártó utasításai szerint, és az eredményeket 24 és 48 óra múlva is leolvastuk. Az E-teszt csíkok egy preformált koncentráció gradiens formájában tartalmazzák a kérdéses antibakteriális vagy antifungális szereket. Ha a kórokozó érzékeny az adott antibakteriális vagy antifungális szerre, akkor a csík körül egy ellipszis alakú (ezért E-teszt) gátlási zóna alakul ki. Ahol az ellipszis metszi a csíkot ott lesz a MIC érték. Ha a MIC-értékek a BMD-ben használt kétszeres hígítások közé estek, az értéket az összehasonlítás céljából a BMD felső határához kerekítettük (Domán és mtsai., 2016). Mivel jelenleg nem állapítottak meg *C. auris*-specifikus érzékenységi határértéket AMB-re, a CDC által javasolt MIC határértéket alkalmaztuk (a ≥ 2 mg/L MIC-el rendelkező izolátumokat rezisztensnek tekintettük) (CDC, 2023).

4.2.3. Minimális fungicid koncentráció

A minimális fungicid koncentráció (MFC) a gyógyszer azon legkisebb koncentrációja, amely a kórokozók legalább 99,9%-át elpusztítja. A standard mikrodilúciós módszer esetén a kezdő csíraszám $\sim 10^3$ CFU/mL, ezért matematikailag lehetetlen lenne a standard MIC meghatározásnál használt csíraszámából a pontos MFC értékeket meghatározni. Ezért az MFC vizsgálatokban a kiindulási csíraszám magasabb volt ($\sim 10^4$ CFU/ml), amiből már ki lehet számítani az MFC értéket. A MIC értékeket 24 óra múlva olvastuk le; majd a MIC érték feletti összes üreg teljes tartalmát Sabouraud dextróz agarra szélesztettük (Sorzó és mtsai., 2007). Az AMB hatását fungicidnek tekintettük, ha kevesebb mint 5 telep nőtt ki 48 órás inkubálás után a táptalajon ($\geq 99,9\%$ -os ölés). Ha 5 vagy több telep nőtt ki, a hatás fungisztikus volt.

4.2.4. Idő-ölés görbék

Az antibakteriális és antifungális szerek *in vitro* ölü aktivitásának a meghatározására szolgáló módszer az idő-ölés görbék felvétele (time-kill method), amely különböző időpontokban határozza meg a különböző antibakteriális vagy antifungális szerek különböző koncentrációinak az ölü aktivitását. Az AMB ölü aktivitását RPMI-1640-ben határoztuk meg 0,25, 0,5, 1 és 2 mg/L koncentrációkban, 10 ml végső térfogatban. A kiindulási csíraszám $3-8 \times 10^5$ CFU/ml voltak és 0, 2, 4, 6, 8, 12 és 24 órás inkubálási idők után 100 μ l-t eltávolítottunk a csövekből. Ezután tízszeres sorozathígításokat készítettünk, és a hígításokból $4 \times 30 \mu$ l szuszpenziót egyetlen Sabouraud dextróz agarra szélesztettünk és 35 °C-on 48 órán át inkubáltuk. Minden kísérletet kétszer végeztünk (Kovács és mtsai., 2021). Az idő-ölés görbék készítésénél a computer curve-fitting software programot használtuk (GraphPad Prism 4.03 Windows verzió).

Az idő-ölés görbe vizsgálatokban az AMB fungicid hatású volt, ha gombáknak legalább 99,9 %-ka elpusztult a kiindulási inokulumhoz képest (Kovács és mtsai., 2021, Hager és mtsai., 2018).

Az ölési kinetikát az $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, összefüggés alapján számoltuk ki, ahol a N_t az élő sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejszám, a k az ölési ráta, a t pedig az inkubációs idő. Pozitív k érték a gombasejtek ölését, míg a negatív k érték a gombasejtek növekedését jelenti. Az illesztés jóságának vizsgálatát, az r^2 használatával ellenőriztük ($>0,8$). A 99,9%-os sejszámcsökkenéshez szükséges időt (h) az egyes AMB koncentrációk esetén, a $T_{99,9} = 3/k$ összefüggés alapján számoltuk ki (Kovács és mtsai., 2021).

4.2.5. Széles látószögű fluoreszcens mikroszkópia

Az AMB által kiváltott morfológiai és életképességi változásokat minden kládból (196, 15, 228 és I-156. izolátum) egy-egy izolátum felhasználásával vizsgáltuk. Az élesztőket 37 °C-on különböző AMB-koncentrációkkal (0, 0,25, 0,5 és 1 mg/L) 24 órán át inkubáltuk; majd a tenyészet 979 μ l-ét 1 μ l 20 mM Propidium-jodiddal (PI) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) és 20 μ l 3 mg/mL Calcoflour-white-tal (CFW) festettük. A fluoreszcensen festett sejteket tovább inkubáltuk 37 °C-on 30 percig; majd 10 μ l sejszuszenziót helyeztünk egy tárgylemezre, és Zeiss Axioskop 2 mot mikroszkóppal, Zeiss AxioCam HRc kamerával összekapcsolva megvizsgáltuk a sejt morfológiát és életképességet. A képfelvétel a Zeiss Axiovision 4.8.2 szoftverrel történt. A CFW válogatás nélkül kötődik a gomba sejtfal

kitartalmához, míg a PI csak az életképtelen sejtekbe hatol be; ezért ez a kettős festési technika alkalmas az életképes és az elhalt gombasejtek megkülönböztetésére.

5. Eredmények

5.1. Középfüli váladékminták analízise

Negyven betegől összesen 64 középfülmintát elemeztünk. Negyven beteg közül 24-nek (60%) volt kétoldali OME. Ötvenkilenc minta (92%) volt legalább egy baktériumra pozitív. Összesen 39 baktériumfajt azonosítottunk (1. táblázat), és 23 beteg (57%) 29 mintájában (49%) találtunk több baktériumot. Ezek közül csak három faj a *Moraxella catarrhalis*, a *H. influenzae* és a *Streptococcus pneumoniae* számít obligát patogénnek az OME-ban (Lundgren és Rundcrantz, 1976; Holder és mtsai., 2015; Liu, 2011). Ez a három kórokozó, 11 beteg 12 mintájában fordult elő, és gyakran kísérték más baktériumfajták is (2. táblázat).

Az *M. catarrhalis* csak polibakteriális eredetű fertőzésekben volt megtalálható. A hatból öt betegnél a *H. influenzae* is más kórokozókkal együtt fordult elő. A *H. influenzae* egy-egy esetben *S. pneumoniae*-val és *S. pyogenes*-szel fordult elő. A *S. pneumoniae* esetén kiemelendő a nagyfokú társulás a *Haemophilus* fajokkal, de az obligát anaerob *Prevotella nigrescens* is fontosnak tűnik.

A MALDI-TOF-al csak alfa-hemolizáló szinten azonosított eseteknél 9 monomikróbás volt, azaz ezekben az esetekben a kóroki szerep valószínűsíthető. Ugyancsak érdekesek a polimikróbás esetek is, hiszen *S. anginosus*, *S. parasanguis* és *S. salivarius*, *H. parainfluenzae* és *H. influenzae*, de még *Neisseria meningitidis* is izolálhatók voltak. Ez utóbbi szerepe különösen érdekes.

Nem találtunk baktériumot két egészséges középfülmintában, amelyek cochlearis implantáción átesett gyermekektől származtak.

1. táblázat: Az azonosított baktériumok listája. Első oszlopban a baktérium nevek, másodikban minták száma, valamint a harmadikban a pozitív betegek száma. (az OME-ben korábban azonosított kórokozó baktériumok félkövér szedéssel).

Faj	Pozitív minták száma	pozitív mintákkal rendelkező betegek száma
<i>Acinetobacter junii</i>	1	1
<i>Acinetobakter lwoffii</i>	2	1
<i>Clostridium butyricum</i>	1	1
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	6
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1	1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3	2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	2
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	1
<i>Neisseria flavescens</i>	2	2
<i>Neisseria lactamica</i>	1	1
<i>Neisseria perflava</i>	1	1
<i>Neisseria sp.</i>	1	1
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1	1
<i>Prevotella denticola</i>	1	1
<i>Prevotella nigrescens</i>	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	3
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	2
<i>Staphylococcus coag.neg</i>	2	2
<i>Staphylococcus condimenti</i>	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	6
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	3
<i>Streptococcus alfa hemolitikus</i>	27	19
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	1
<i>Streptococcus oralis</i>	1	1
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3	3
<i>Streptococcus peroris</i>	2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	5	5
<i>Streptococcus simulans</i>	1	1
<i>Veillonella parvula</i>	1	1
<i>Veillonella atypica</i>	1	1

2. táblázat: A korábbi vizsgálatok során az OME-ban azonosított kórokozók táblázata és azok aránya. Első oszlopban az ezekkel a kórokozókkal rendelkező minták és a másodikban a hozzátartozó betegek száma, valamint az ezekben a mintákban egy és több baktérium jelenlétét mutató esetek száma (harmadik és negyedik oszlop) és a kísérő baktériumok megnevezése (4. oszlop).

Otopatogén	minták száma	betegek száma	monobakteriális fertőzés száma	polibakteriális fertőzések száma
<i>M. catarrhalis</i>	2	2	0	<ul style="list-style-type: none"> • α-hemolizáló <i>Streptococcus</i> • <i>Neisseria flavescens</i>
<i>H. influenzae</i>	6	6	1	<ul style="list-style-type: none"> • α-hemolizáló <i>Streptococcus</i> (2 beteg) • <i>S. pneumoniae</i> • <i>S. pyogenes</i> és <i>S. salivarius</i> • <i>S. epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	4	3	1	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. influenzae</i> • <i>H. parainfluenzae</i>, <i>H. parahaemolyticus</i> és <i>Prevotella nigrescens</i> • <i>Acinetobacter lwoffii</i>

5.2. *Candida auris*-szal végzett vizsgálatok eredményei

5.2.1. MIC meghatározása mikro-leveshígítással és E-teszt módszerekkel

Módszerektől és kládoktól függetlenül a MIC értékek soha nem voltak magasabbak, mint a CDC által javasolt érzékenységi határérték (1 mg/L) (3. táblázat) (CDC, n.d.). A BMD alkalmazásával (CDC, n.d.) a legalacsonyabb (0,12-0,25 mg/L) és a legmagasabb (0,5-1 mg/L) MIC-érték tartományokat a kelet-ázsiai illetve a dél-ázsiai kládoknál találtuk. E-teszt esetén a 22 izolátum MIC-értékei 24 és 48 óra elteltével 77%-os (17/22) illetve 91%-os (20/22) egyezést mutattak \pm egy hígításon belül, összehasonlítva a BMD MIC 24 óra elteltével mért értékeivel.

3. táblázat: A kísérletben használt *Candida auris* izolátumok. Az amphotericin B MIC-értékeket a standard mikro leves-hígítási módszer (BMD) és E-teszt módszerekkel határoztuk meg. Az E-teszt módszer esetén a MIC értékeket 24 és 48 óra után is leolvastuk.

Klád	Izolátum száma	Testtájék	MIC (mg/L)			
			BMD (CFU/ml)		E-teszt	
			10 ³	10 ⁴	24h	48óra
Dél-ázsiai	10	Sebváladék	0.5	2	0.5	0.5
	12	Ismeretlen	0.5	1	0.12	0.25
	20 (NCPF 8985)	Seb	0.5	1	0.25	0.5
	27 (NCPF 89891)	Pleurális folyadék	0.5	1	0.25	0.5
	174	Orrváladék	1	2	0.25	1
	196	Vér	1	2	0.5	1
Kelet-ázsiai	15 (NCPF 8984)	Külső fül	0.25	1	0.25	0.5
	12372 (CBS 12372)	Vér	0.12	1	0.25	1
	12373 (CBS 12373)	Vér	0.25	1	0.25	1
	Típustörzs (NCPF 13029=CBS 10913)	Külső fül	0.25	1	0.12	0.25
Dél-afrikai	2 (NCPF 8977)	Liquor	0.5	1	0.25	0.5
	182	Köpet	0.25	2	0.5	0.5
	185	Vér	0.5	1	0.25	0.5
	204	Tracheostoma	0.5	1	0.25	0.5
	206	Vér	0.5	2	0.25	0.5
	228	Szűrő kenet	0.5	2	0.5	1
Dél-amerikai	13108 (CDC B-13108)	Kórházi környezet	0.25	1	0.25	0.5
	13112 (CDC B-13112)	Kórházi környezet	0.5	1	0.12	0.25
	16565 (CDC B-16565)	Kórházi környezet	0.25	1	0.25	0.5
	I-24	Vér	1	2	0.25	1
	I-156	Vér	1	1	0.25	1
	I-172	Vér	0.5	2	0.25	0.5

5.2.2. Minimális fungicid koncentrációk

A magasabb kiindulási inokulummal (~10⁴ CFU/ml) kapott MIC értékek 2-8-szorosára nőttek a standard BMD-vel kapott MIC értékekhez képest (~10³ CFU/ml), kivéve az I-156 izolátumot (dél-amerikai klád) (3. táblázat). Az MFC érték egységesen 2 mg/L volt a dél-afrikai klád mind a hat izolátuma esetében. Az MFC tartományok 1-4 mg/L, 2-4 mg/L és 2-8 mg/L között voltak a dél-ázsiai, a kelet-ázsiai és a dél-amerikai kládok esetében (4. táblázat). Az MFC/MIC arány 2–4, 8–32, 4–8 és 4–16 volt a dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai és dél-amerikai kládoknál.

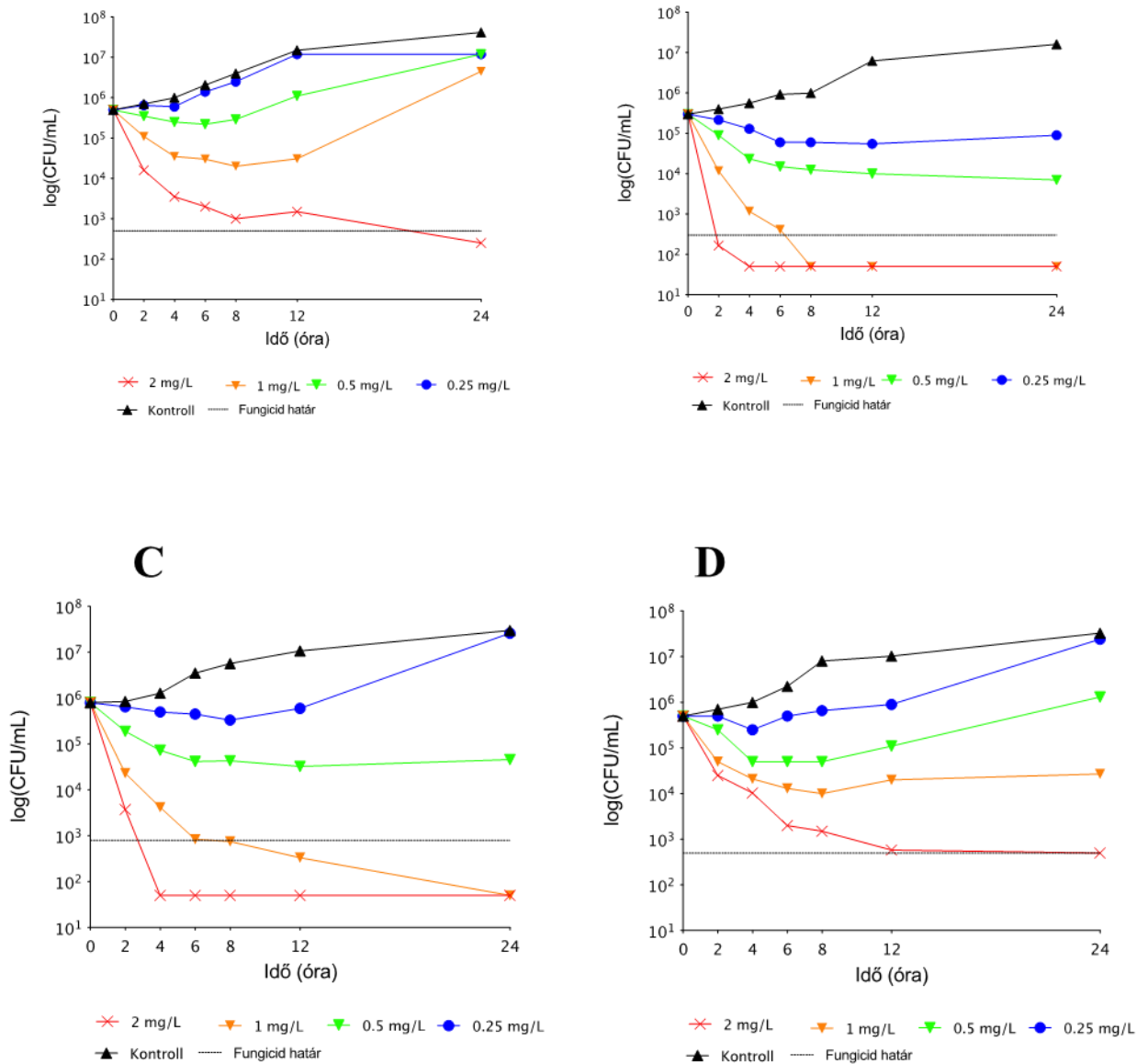
4. táblázat: Amphotericin B (AMB) minimális fungicid koncentrációi (MFC) és az amphotericin B által kiváltott maximális csíraszám csökkenés a kezdő csíraszámhoz képest (log CFU/mL) az idő-ölés kísérletekben a *C. auris* négy kládjába tartozó izolátumok ellen. A félkövér számok fungicid hatást jeleznek (legalább 3 log csökkenés a CFU-ban). NK: nincs ölés.

Klád	Izolátum száma	MFC (mg/L)	Az idő-ölés vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám csökkenés (log) a jelzett AMB koncentrációkon (mg/L)			
			0.25	0.5	1	2
Dél-ázsiai	10	2	-0,43	-1,04	-1,9	-3,9
	12	2	-2,08	-2,3	-3,78	-3,78
	20	1	-0,74	-2,86	-3,78	-3,78
	27	2	-0,32*	-1,0	-1,6	-3,6
	174	2	NK	-0,30*	-1,20*	-3,30
	196	4	NK	-0,18*	-0,32*	-1,22
Kelet-ázsiai	15	2	-0,46*	-0,79	-1,47	-3,90
	12372	4	-3,26	-3,26	-3,78	-3,78
	12373	2	-0,38*	-1,22	-1,88	-3,78
	Típustörzs	2	-0,74*	-1,60	-3,78	-3,78
Dél-afrikai	2	2	-0,40*	-1,62	-3,78	-3,78
	182	2	-0,38*	-1,39*	-4,20	-4,20
	185	2	-0,32*	-0,90	-2,23	-3,90
	204	2	-1,09	-2,38	-3,78	-3,78
	206	2	-0,30*	-1,03	-2,41	-4,15
	228	2	NK	-0,46*	-1,48	-2,50
Dél-amerikai	13108	2	-0,48*	-1,78*	-3,78	-3,78
	13112	2	-0,32*	-0,96*	-1,78	-3,60
	16565	2	-0,88*	-1,18*	-1,82	-3,08
	I-24	8	NK	-0,79*	-1,05*	-1,85
	I-156	4	NK	-0,25*	-0,63*	-1,40*
	I-172	8	-0,30*	-1,00*	-1,70*	-3,00

* újranoelkedés

5.2.3. Idő-ölés kísérletek eredményei

Az AMB $\geq 0,5 \times \text{MIC}$ értékeken koncentráció-függő ölü aktivitást mutatott a *C. auris* izolátumokkal szemben. A CFU-csökkenés azonban gyakran átmeneti volt, és 12 óra elteltével még kétszeres MIC értéknél is újranoelkedés volt megfigyelhető. A 6. ábrán az egyes kládok reprezentatív idő-ölési görbéi láthatók.



6. ábra: Amphotericin B idő-ölés görbéi a *Candida auris* 174-es számú dél-ázsiai (A), a kelet-ázsiai típusörzs (NCP13029 = CBS 10913) (B), a dél-afrikai 182-es (C) és a dél-amerikai I-172-es (D) kládokhoz tartozó izolátumai ellen.

5.2.3.1. Dél-ázsiai klád

A hat klinikai izolátum ellen 1 mg/L AMB két, míg a 2 mg/L AMB öt klinikai izolátum ellen fungicid hatásának bizonyult. A 174-es és 196-os izolátumok esetében a MIC értéknél (1 mg/L) csak az első 8-12 órában volt kimutatható CFU csökkenés (4. táblázat), ezt követően mindkét izolátumnál újránövekedés volt megfigyelhető és a *k* értékek negatívak voltak (4. táblázat). Bár a 174-es izolátum esetében az AMB 2 mg/L-nél ($T_{99,9} = 1,96$ óra) fungicid hatású volt (5. táblázat), a 196-os izolátum (MFC=4 mg/L) esetében csak gyenge fungisztikus hatást (-1,22-log CFU/mL csökkenés) találtunk.

5.2.3.2. Kelet-ázsiai klád

Az AMB $\geq 0,5$ mg/L-nél újránövekedés nélkül csíraszámcsökkenést eredményezett az összes izolátum esetén. A típustörzs ellen az 1 mg/L AMB ($4 \times \text{MIC}$) 1,77 óra után fungicid hatású volt. Annak ellenére, hogy az 12372-es izolátum esetén az MFC érték 4 mg/L volt, $\geq 0,25$ mg/L az AMB ($\geq 2 \times \text{MIC}$) fungicid hatást fejtett ki (a T99,9 tartományok 1,21–4,24 óra, 5. táblázat). Az AMB a 15-ös és 12373-as izolátumok ellen, az MFC értéküknél (2 mg/L) 0,79, illetve 3,05 óra alatt $\geq 99,9\%$ -os csíraszám csökkenést eredményezett (5. táblázat).

5.2.3.3. Dél-afrikai klád

Egy mg/L AMB a 6 klinikai izolátum közül csak 3 esetben, míg 2 mg/L 5 klinikai izolátum ellen mutatott fungicid hatást. A 182-es izolátum 0,5 mg/L AMB esetén ($2 \times \text{MIC}$) újránövekedést mutatott, de ≥ 1 mg/L AMB ($\geq 4 \times \text{MIC}$) 1,32–2,22 óra elteltével fungicid hatást eredményezett (5. táblázat). A 185, a 206 és a 228 izolátumok esetében maximális CFU-csökkenés 1 mg/L-nél nem haladta meg a 2,41 log értéket a (5. táblázat). Bár a 228-as izolátum MFC értéke 2 mg/L volt, 2 mg/L AMB ($4 \times \text{MIC}$) mellett a CFU értékek csak 2,50-loggal csökkentek.

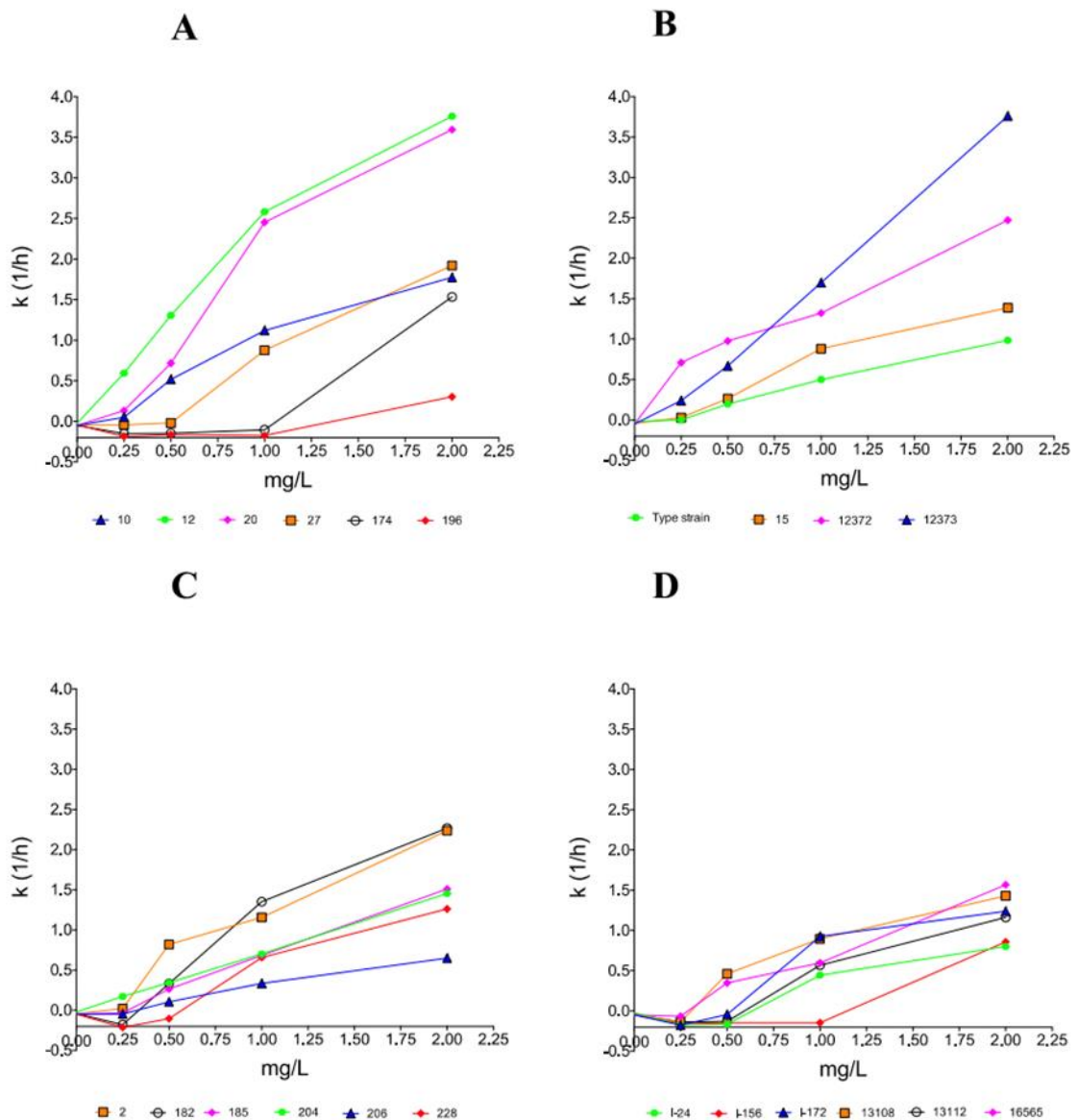
5.2.3.4. Dél-amerikai klád

Minden izolátum az egyszeres MIC értéknél és gyakran a kétszeres MIC értéknél 24 óra elteltével újbóli növekedést mutatott. Egy mg/L-nél csak az 13108-as izolátum esetén volt fungicid hatás (a T99,9, 3,35 óra volt), és a hat izolátum közül öt nem érte el még a 99%-os csíraszám csökkenést (fungisztikus hatás) sem a kiindulási inokulumhoz képest (5. táblázat). Bár a három környezeti izolátum az MFC értéküknél (2 mg/L) elpusztult (a T99,9 értékek 1,91–2,58 óra voltak), két véráram-izolátum (I-24 és I-156) nem érte el a 99%-os növekedéscsökkenést. Az I-156 izolátum esetében a k érték csak 2 mg/L-nél volt pozitív ($k=0,859$ 1/h); 12 óra elteltével azonban újránövekedés volt megfigyelhető (7. ábra).

5. táblázat: A 99%-os (T99) és 99,9%-os (T99,9) növekedéscsökkenés eléréséhez szükséges idő (h) különböző amphotericin B koncentrációk (mg/L) esetén.

Klád	Izolátum száma	Idő (óra)							
		T99				T99,9			
		0,25 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
Dél-ázsiai	10	*NA	NA	1.79	1.12	NA	NA	NA	1.69
	12	3.36	1.53	0.78	0.53	NA	NA	1.16	0.79
	20	NA	2.79	0.82	0.56	NA	NA	1.22	0.84
	27	NA	NA	NA	1.04	NA	NA	NA	1.56
	174	**NK	NK	NK	1.30	NK	NK	NK	1.96
	196	NK	NK	NK	NA	NK	NK	NK	NA
Kelet-ázsiai	15	NA	NA	NA	0.53	NA	NA	NA	0.79
	12372	2.82	2.05	1.51	0.81	4.24	3.08	2.27	1.21
	12373	NK	NA	NA	2.03	NK	NA	NA	3.05
	Típustörzs	NA	NA	1.18	0.53	NA	NA	1.77	0.79
Dél-afrikai	2	NA	NA	1.73	0.89	NA	NA	2.59	1.34
	182	NK	6.05	1.48	0.88	NK	NA	2.22	1.32
	185	NK	NA	2.93	1.33	NK	NA	NA	1.99
	204	NA	5.85	2.86	1.38	NA	NA	4.29	2.07
	206	NK	NA	6.00	3.08	NK	NA	NA	4.62
	228	NK	NK	NA	1.59	NK	NK	NA	NA
Dél-amerikai	13108	NK	NA	2.23	1.39	NK	NA	3.35	2.10
	13112	NK	NK	NA	1.72	NK	NK	NA	2.58
	16565	NK	NA	NA	1.28	NK	NA	NA	1.91
	I-24	NK	NK	NA	NA	NK	NK	NA	NA
	I-156	NK	NK	NK	NA	NK	NK	NK	NA
	I-172	NK	NK	NA	1.62	NK	NK	NA	2.42

*NA: nincs adat. NK: nincs ölés

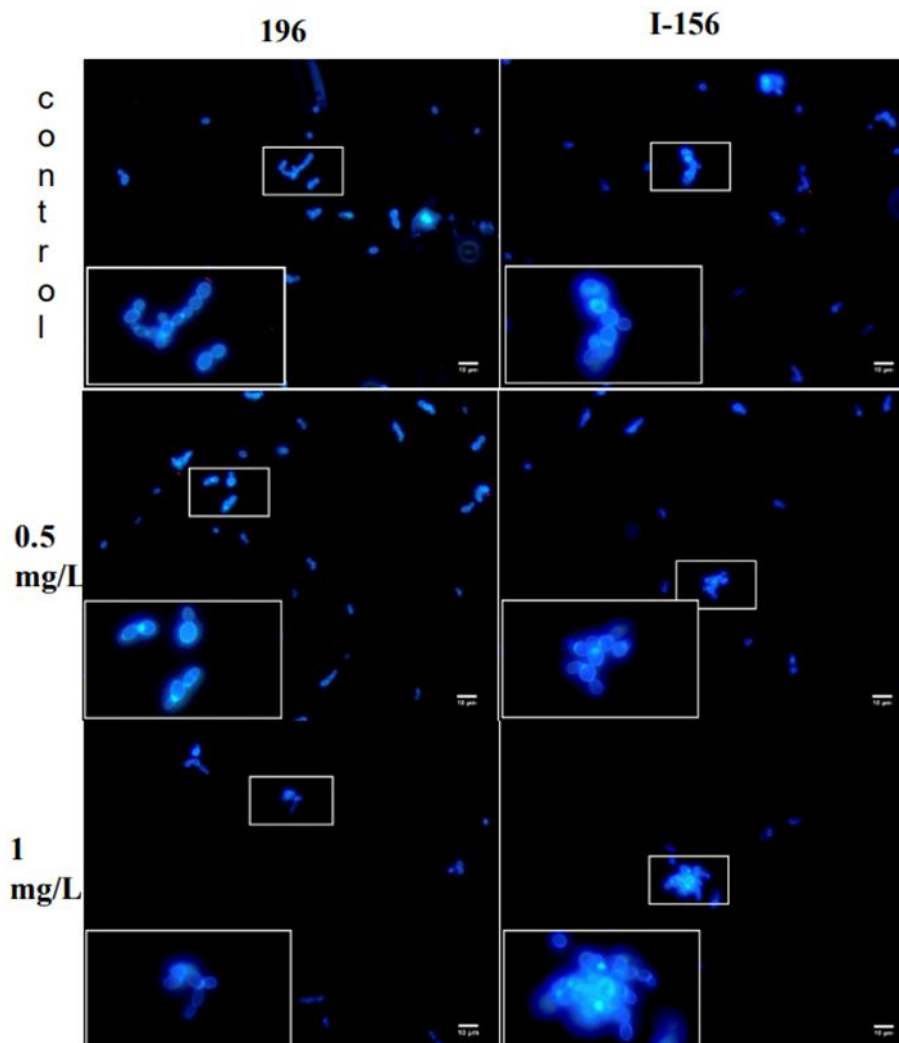


7. ábra: Az amphotericin B ölési ráta értékei a dél-ázsiai (A), a kelet-ázsiai (B), a dél-afrikai (C) és a dél-amerikai (D) kládokhoz tartozó 22 *Candida auris* izolátummal szemben. A pozitív és negatív k értékek az életképes sejtek számának csökkenését, illetve növekedését jelzik. A regressziós egyeneseket a jobb láthatóság érdekében nem tüntettük fel.

5.2.4. Széles látászögű fluoreszcens mikroszkópia

A 196-os, 15-ös és 228-as kontroll izolátumoknál blasztonidiumokat (gombasejtek egyesével), bimbózó sejteket vagy rövid láncokat figyeltünk meg. Az I-156 izolátumnál a kontroll megjelenése hasonló volt, de gyakran kis aggregátumok voltak megfigyelhetők (legfeljebb 10-15 sejt). A 196-os, a 15-ös és a 228-as izolátumoknál 0,25-1 mg/L AMB esetén hasonló morfológiát és sejtszám csökkenést tapasztaltunk, de az I-156 izolátum esetében 1

mg/L-nél nagy, legfeljebb 50 sejtből álló aggregátumokat figyeltünk meg (8. ábra). A PI felvételét, amely elpusztult sejtek jelenlétét jelzi, soha nem észleltük.



8. ábra: *Candida auris* sejteket (196-os izolátumok, dél-ázsiai klád és I-156, dél-amerikai klád) 0,5 és 1 mg/L amphotericin B-vel kezeltük, és széleslátóterű fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Gyógyszermentes kontrollokat is vizsgáltunk. 24 óra elteltével mikrofelveleket készítettünk. A kék sejtek életképes sejteket jeleznek. A 196-os izolátum (balra) esetében a sejtszám csökkenését észleltük 1 mg/L amphotericin B koncentrációnál. Az I-156 izolátumnál (jobbra) 1 mg/L amphotericin B koncentrációnál nagy aggregátumok láthatók, legfeljebb 50 sejtrel. Az elhalt sejteket soha nem észleltük. Méret: 10 µm.

6. Megbeszélés

6.1. Betegcsoport analízis megbeszélése

Az OME-t több évtizede széles körben vizsgálják. Az etiológia alapelveit az 1960-as években határozták meg. Úgy ítélték meg, hogy az Eustach-kürt diszfunkciójának alapvető kiváltó szerepet kell játszania a betegség kialakulásában (Blustone, 1996; Kirkup, 2013; Sade, 1966; Tos és mtsai., 1979). Később az OME etiológiáját fokozatosan új elméletek egészítették ki. Bakteriális (Tos és Bak-Pedersen, 1972) és vírusos gyulladáshatások (Massa és mtsai., 2009), romlott mucociliaris funkció (Gurr és mtsai., 2009), IgE által közvetített allergiás reakció és atópia (Kreiner-Møller és mtsai., 2012), laryngopharyngealis reflux (Luo és mtsai., 2014), nem megfelelő gazdaválasz a gyulladáshatások és a receptor polimorfizmus miatt (Lee és mtsai., 2013) és a közelmúltban a bakteriális biofilm jelenléte (Daniel és mtsai., 2012) jelent meg etiológiai tényezőként, bár ezek egy része még mindig vitatott. Jelenleg az OME multifaktoriális immunológiai betegséggel számít. Mivel tanulmányunk rámutat a többszörös baktérium jelenlétének fontosságára, érdekes és érdemes lesz feltárni, hogy ez a jelenlét miként kapcsolódik ok-okozati összefüggésbe a középfül különböző hiányos immunfunkcióival és más biofizikai paramétereivel, mint például az Eustach-kürt miatti elégtelen szellőzés vagy 3D morfoanatómia.

A betegek kiválasztásánál az anamnesztikus adatok voltak a legfontosabbak a felvétel során, mivel a betegséget várhatóan nem kísérik akut jelek és tünetek. A legegyszerűbb és legolcsóbb elérhető diagnosztikai eszköz a középfülben lévő folyadék ellenőrzésére a pneumatikus otoscop. Ez rendelkezik a legjobb egyensúllyal az érzékenység és a specifitás között (Rosenfeld és mtsai., 2004). Magasabb pénzügyi és adminisztratív terhei ellenére a tympanometria a rutin klinikai gyakorlatban is megbízható diagnosztikai eszközzel számít (Palma és mtsai., 1999). Mivel a vizsgálathoz elengedhetetlen volt az objektív dokumentálás, ez utóbbi diagnosztikai módszert alkalmaztuk.

A legújabb irányelvek szerint az OME csak akkor igényel terápiát, ha a tünetek több mint 6 hónapig fennállnak, és nem múlnak spontán módon. A jelentős hallásvesztés, a dobhártya, vagy a középfül feltételezett szerkezeti rendellenességei szintén olyan állapotok, amelyek szükségessé teszik az OME kezelését (Gates és mtsai., 1987). Az elmúlt évtizedekben számos terápiás stratégiát kipróbáltak, de ezek többsége hatástalannak bizonyult. A MEE bőséges bakteriális flórája arra utal, hogy a bakteriális interferencia szerepet játszhat a betegség hosszú távú fennmaradásában.

A középfüli váladékot MALDI-TOF MS segítségével pontosan lehet vizsgálni. Ez a módszer több mint kétezer baktériumfaj egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé, így könnyen azonosítható egy hatalmas, változatos és bőséges baktériumflóra. A középfüli váladék bakteriális mintázata az akut otitis media (AOM) flórájához hasonlít, bár a jelenlegi tanulmányban több fajta patogént és más baktériumfajt azonosítottunk, mint a korábbi vizsgálatokban. Ráadásul a mintáknak csak egy része volt pozitív *M. catarrhalis*-ra, *H. influenzae*-re és *S. pneumoniae*-re, azon kórokozókra, amelyekről korábban úgy gondolták, hogy hozzájárulnak az OME-hez (Holder és mtsai., 2015; Liu, 2011; Lundgren, 1976). A minták többsége nem tartalmazta ezeket a baktériumokat, azonban más baktériumokat azonosítottunk bennük. Ezek egy része nyilvánvaló patogén szerepet játszik más típusú fertőzésekben, mások nem patogén vagy fakultatív kórokozók.

6.2. *Candida auris*

A kládoktól és izolátumoktól függetlenül a standard BMD és E-teszt (24 és 48 óra elteltével) módszerekkel végzett MIC értékek nem voltak magasabbak, mint a CDC által a *C. auris*-ra javasolt érzékenységi határérték (1 mg/L) (CDC, n.d.). Az AMB az MFC-t meghatározó vizsgálatokban 24 óra elteltével a 4 legelterjedtebb *C. auris* kláddal szemben fungicidnek bizonyult 1-8 mg/L tartományban; az MFC értékek 2-32-szer magasabbak voltak, mint a BMD módszerrel kapott MIC értékek. Fontos, hogy a 20-as izolátum (dél-ázsiai klád) kivételével ezek az MFC értékek magasabbak voltak, mint a klinikailag elérhető AMB koncentráció a szérumban (1 mg/L) (Lockhart és mtsai., 2017). Idő-ölés kísérleteinkben az AMB koncentráció-, klád- és izolátumfüggő ölü aktivitást mutatott a *C. auris* izolátumok ellen. Az MFC-eredmények az 12372-es (kelet-ázsiai klád), a 228-as (dél-afrikai klád) és az I-172-es (dél-amerikai klád) izolátumok kivételével jó korrelációt mutattak az idő-ölési eredményekkel (4. táblázat)

Az AMB a klinikailag elérhető 1 mg/L-nél a dél-ázsiai kládból származó hat izolátum esetén kettőnél, a kelet-ázsiai kládból négyből szintén kettőnél, a dél-afrikai klád esetén hatból három, illetve a dél-amerikai kládnál a hatból egy izolátum esetén bizonyult fungicidnek. Ezenkívül a dél-ázsiai és dél-amerikai kládokból származó 6-6 izolátumból kettő, illetve három izolátum 1 mg/L mellett újranoelkedést mutatott. Széles látószögű fluoreszcens mikroszkóppal a 196-os, 15-ös és 228-as izolátumok sejtszámának csökkenését mutattuk ki, míg az I-156 izolátum esetében 1 mg/L-nél nagy aggregátumokat találtunk (6. ábra), de elhalt sejteket soha nem mutattunk ki. Eredményeink alapján a szérumban klinikailag elérhető koncentrációkon (≤ 1 mg/L) az AMB nem biztos, hogy fungicid hatású egyik vizsgált *C. auris* kláddal szemben sem.

Az AMB *C. auris* elleni *in vitro* ölési aktivitásáról kevés adat áll rendelkezésre; korábban kilenc kolumbiai véráram-izolátumot tanulmányoztak (Dudiuk és mtsai., 2019). Ebben a vizsgálatban az AMB az MFC tesztekben 2-4 mg/L-en (1-4xMIC) fungicid hatású volt és koncentrációfüggő, de izolátum-független ölési aktivitást mutatott >2 mg/L koncentrációnál az idő-ölés vizsgálatokban. A T99,9 (az az időtartam, amely alatt legalább 99,9%-al csökken a gombasejtek száma a kiindulásihoz képest) értéktartományok szignifikánsan hosszabbak voltak (3,3 és 11,7 óra között, a megfelelő *k* értékek 0,256 és 0,913 1/óra között voltak), mint a saját vizsgálatainkban szereplő 4 izolátumunk T99,9 értékei (2 mg/L esetén). Dudiuk és mtsai (2019) azonban csak egy átlagolt *k* érték alapján számították a T99,9 értékeket, azaz egyetlen *k* érték reprezentálta az egyes törzsek 0,12-8 mg/L tartományában az ölési kinetikát. Figyelemre méltó, hogy a fennmaradó két izolátumunk (I-24 és I-156) esetében fungicid hatást nem észleltünk 2 mg/L-nél (4. táblázat).

A dél-ázsiai, kelet-ázsiai és dél-afrikai kládokból származó izolátumok elleni AMB ölési aktivitásról szóló előzetes tanulmányok hiánya miatt nem volt lehetőségünk független eredményekkel való összehasonlítást végezni.

Sajnos, a vizsgált izolátumaink közül csak két izolátum (a kelet-ázsiai kládból) származott otitis externában szenvedő betegtől. Vizsgálatainkban azonban nagyszámú (22 izolátum), a négy fő kládhoz tartozó *C. auris* törzs ellen határoztuk meg az AMB *in vitro* aktivitását, ami munkánk fő erősségének számít. Ezeket az eredményeket később *in vivo* neutropeniás egérmodellben megerősítettük (Forgács és mtsai. 2022). Lepak és mtsai. (2017), 5 mg/kg AMB kezelés esetén a négy kládba tartozó kilenc *C. auris* izolátummal szemben főként fungisztikus hatást tapasztaltak (9 izolátumból 8 esetében), illetve egy esetben az AMB kezelés ellenére növekedett a vesékből kitenyészett gombasejtek száma. Érdekesség, hogy a 9 vizsgált izolátumnál csak 3 esetben sikerült 1-log csökkenést elérni. Magas AMB MIC értékkel (2-4 mg/L) rendelkező izolátumokkal fertőzött egerek veséiből kitenyészett gombasejtek száma az AMB-kezelés ellenére nőtt (Hager és mtsai., 2018).

Eredményeink alapján a klinikailag elérhető koncentráción (≤ 1 mg/L) az AMB fungicid hatású volt a négy földrajzi kládból származó izolátumok 16,7-50%-ával szemben. Az AMB gyenge ölési aktivitásának háttere a nem AMB rezisztens izolátumaink ellen nem ismert. Az ergoszterin bioszintézis génjeinek mutációit már korábban is jelentették ilyen izolátumokban, de nem minden AMB rezisztens izolátum mutatott ilyen mutációt. Egy másik vizsgálatban nem találtak mutációt a kolumbiai AMB rezisztens *C. auris* izolátumok ergoszterin bioszintézis génjeiben. Négy alternatív AMB rezisztencia mechanizmust írtak le, beleértve az élesztőkben a FLU8-hoz hasonló transzkripciósfaktort kódoló gének mutációit és egy feltételezett

membrántranszportert (Escandón és mtsai., 2019). Egy másik lehetséges mechanizmus az, hogy a sejtfa­l összetevőinek, különösen a β -1,3-glükánnak vagy a kitinnek a megváltozása fizikailag csökkentheti az AMB bejutását a sejtekbe (Carolus és mtsai., 2020; Montoya és mtsai., 2019). Az AMB *C. auris* sejtekbe való behatolásának csökkenését az I-156 izolátumunk támasztotta alá, amely 1 mg/L AMB jelenlétében nagy aggregátumokat képzett (8. ábra). Bár a klinikai relevancia továbbra sem ismert, figyelemre méltó, hogy az AMB-vel szemben ellenállóbb két klád (dél-ázsiai és dél-amerikai) korábbi vizsgálatainkban neutropéniás egérmodellben a legvirulensebbnek bizonyult (Forgács és mtsai., 2020).

Az MFC és az idő-ölési eredményeink felhívják a figyelmet az AMB gyenge ölési aktivitására a *C. auris* izolátumokkal szemben, függetlenül a kládtól, még akkor is, ha a MIC érték alacsony (≤ 1 mg/L). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az AMB hatásossága az invazív *C. auris* fertőzések, köztük az agyhártyagyulladás, az endophthalmitis és a húgyúti fertőzések kezelésében a MIC eredmények alapján nem jósolható meg megbízhatóan, ami megmagyarázhatja az AMB kezelése­k során tapasztalt magas mortalitást (Lockhart és mtsai., 2017; Sekyere, 2018). Az echinocandinok és az AMB kombinációja azonban javíthatja a túlélést (Chowdhary és mtsai., 2020).

7. Összefoglalás

A tanulmányunk azt mutatja, hogy a MALDI-TOF MS alkalmas a középfüli váladék bakteriális összetételének értékelésére krónikus szerózus középfülgyulladásban szenvedő gyermekek esetében. Bár a jelenlegi megközelítésben ez a technika csak a tenyészthető baktériumokat észleli, javítja azon képességünket, hogy a hagyományos baktériumtenyésztési megközelítéshez képest baktériumfajok bővebb spektrumát detektáljuk, és képes a fajok azonosítására. A baktériumok jelenléte az OME-ban nyilvánvaló. Vizsgálatunk azt sugallja, hogy az OME esetében a többfajú bakteriális flóra központi szerepet játszhat a folyadék tartós jelenlétében a középfülben, vagy az OME természetes és obligát kísérő jelensége lehet. Ez a korábban nem leírt bakteriális jelenlét hozzájárulhat az OME megfelelő megértéséhez és kezeléséhez.

A *C. aurisszal* végzett kísérleteink egyértelműen mutatták, hogy még alacsony MIC ($\leq 1\text{mg/L}$) értékkel rendelkező izolátumok esetén is, az AMB gyenge ölü aktivitással rendelkezik a *C. auris* izolátumokkal szemben. Idő-ölés kísérleteink a metodikából következő (dinamikus nyomon követése az AMB által kifejtett ölésnek) világosan mutatták, hogy az AMB koncentráció-, klád- és izolátumfüggő ölü aktivitást mutatott a *C. auris* izolátumok ellen, gyakori újránövekedéssel. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az AMB hatékonysága az invazív *C. auris* fertőzések kezelésében, beleértve a meningitist, az endophthalmitist és a húgyúti fertőzéseket a MIC eredmények alapján nem jósolható meg, ami megmagyarázhatja az AMB kezelés során jelentkező magas mortalitást. Bár az echinocandinok és az AMB kombinációja javíthatja a túlélést, a hagyományos vagy új célpontokkal rendelkező új gombaellenes szerek felfedezése elengedhetetlen a multirezisztens gombák, köztük a *C. auris* fertőzések túlélési arányának javításához.

8. Summary

Our study shows that MALDI-TOF MS is suitable for evaluating the bacterial composition of middle ear secretions in children with chronic serous otitis media. Although in the current approach this technique only detects bacteria that can be cultured, it improves our ability to detect a wider spectrum of bacteria compared to traditional bacterial culture approaches and is able to identify even species. The presence of bacteria in otitis media with effusion (OME) is obvious. Our study suggests that for OME, multispecies bacterial flora may play a central role in the persistent presence of fluid in the middle ear, or it may be a natural and obligatory accompanying phenomenon of OME. This previously undescribed bacterial presence may contribute to the proper understanding and treatment of OME.

Our experiments with *C. auris* clearly showed that even with isolates with a low MIC (≤ 1 mg/L), AMB has weak killing activity against *C. auris* isolates. Our time-kill experiments based on the methodology (dynamic tracking of AMB killing) clearly showed that AMB exhibited concentration-, clade- and isolate-dependent killing activity against *C. auris* isolates with frequent regrowth. These data suggest that the efficacy of AMB in treating invasive *C. auris* infections, including meningitis, endophthalmitis, and urinary tract infections, cannot be predicted based on MIC results, which may explain the high mortality during AMB treatment. Although the combination of echinocandins and AMB may improve survival, the discovery of new antifungal agents with conventional or new targets is essential to improve survival rates for multidrug-resistant fungi, including *C. auris* infections.

9. Rövidítések jegyzéke

AMB	Amphotericin B
BMD	broth microdilution method / mikro-leveshígítási módszer
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cSOM	chronic serous otitis media / krónikus savós középfülgyulladás
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry
MEE	middle ear effusion / középfüli váladékgyülem
OE	otitis externa / külsőfülgyulladás
OME	otitis media with effusion / középfülgyulladás váladékgyülemmel
TM	tympanic membrane / dobhártya

10. Irodalomjegyzék

10.1. Hivatkozott közlemények

Agius AM, Pickles JM, Burch, KL. 1992. A Prospective Study of Otitis Externa. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 17(2):150–154

Beers SL, Abramo TJ. 2004. Otitis Externa Review. *Pediatr Emerg Care.* 20(4):250–254

Billamboz M, Fatima Z, Hameed S, Jawhara S. 2021. Promising Drug Candidates and new Strategies for Fighting Against the Emerging Superbug *Candida auris*. *Microorganisms.* 9(3):634

Bluestone CD. 1996. Pathogenesis of Otitis Media: Role of Eustachian Tube. *Pediatr Infect Dis J.* 15(4):281–291

Borman AM, Szekely A, Johnson EM. 2016. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere.* 1(4): e00189-16

Burke P, Bain J, Robinson D, Dunleavey J. 1991. Acute Red Ear in Children: Controlled Trial of non-Antibiotic Treatment in General Practice. *BMJ.* 303(6802):558–562

Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. 2020. Amphotericin b and other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *J Fungi.* 6(4):321

CDC. 2023. Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation | *Candida auris* | Fungal Diseases | CDC. November 24, 2023. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>

Chow NA, de Groot T, Badali H, Abastabar M, Chiller TM, Meis JF. 2018. Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerg Infect Dis.* 25(9):1780–1781

Chowdhary A, Tarai B, Singh A, Sharma A. 2020. Multidrug-resistant *Candida auris* Infections in Critically ill Coronavirus Disease Patients, India, April–July 2020. *Emerg Infect Dis.* 26(11):2694-2696

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Fourth Edition: M27. CLSI, Wayne, PA, USA, 2017.

- Daniel M, Imtiaz-Umer S, Fergie N, Birchall JP, Bayston R. 2012. Bacterial Involvement in Otitis Media with Effusion. *Int J Pediat Otorhinolaryngol.* 76(10):1416–1422
- Domán M, Kovács R, Kardos G, Gesztelyi R, Juhász B, Bozó A, Kardos T, Saleh Q, Majoros L. 2016. Killing Rates of Caspofungin in 50 Percent Serum Correlate with Caspofungin Efficacy Against *Candida albicans* in a Neutropenic Murine Model. *Curr Drug Deliv.* 13(2):255-264
- Dudiuk C, Berrio I, Leonardelli F, Morales-Lopez S, Theill L, Macedo D, Yesid-Rodriguez J, Salcedo S, Marin A, Gamarra S, Garcia-Effron G. 2019. Antifungal Activity and Killing Kinetics of Anidulafungin, Caspofungin and Amphotericin B against *Candida auris*. *J Antimicrob Chemother.* 74(8):2295-2302
- Escandón P, Chow NA, Caceres DH, Gade L, Berkow EL, Armstrong P, Rivera S, Misas E, Duarte C, Moulton-Meissner H, Welsh RM, Parra C, Pescador LA, Villalobos N, Salcedo S, Berrio I, Varón C, Espinosa-Bode A, Lockhart SR, Jackson BR, Litvintseva AP, Beltran M, Chiller TM. 2019. Molecular Epidemiology of *Candida auris* in Colombia Reveals a Highly Related, Countrywide Colonization with Regional Patterns in Amphotericin B Resistance. *Clin Infect Dis.* 68(1):15-21
- Forgács L, Borman AM, Prépost E, Tóth Z, Kardos G, Kovács R, Szekely A, Nagy F, Kovacs I, Majoros L. 2020. Comparison of in vivo Pathogenicity of four *Candida auris* Clades in a Neutropenic Bloodstream Infection Murine Model. *Emerg Microbes Infect.* 9(1):1160-1169
- Forgács L, Borman AM, Kovács R, Balázsi D, Tóth Z, Balázs B, Chun-Ju C, Kardos G, Kovacs I, Majoros L. 2022. In Vivo Efficacy of Amphotericin B against Four *Candida auris* Clades. *J. Fungi.* 8(5):499-503
- Gates GA, Avery CA, Prihoda TJ, Cooper JC. 1987. Effectiveness of Adenoidectomy and Tympanostomy Tubes in the Treatment of Chronic Otitis Media with Effusion. *N Engl J Med.* 317(23):1444–1451
- Gurr A, Stark T, Pearson M, Borkowski G, Dazert S. 2009. The Ciliary Beat Frequency of Middle ear Mucosa in Children with Chronic Secretory Otitis Media. *Eur Arch Otorhinolaryngol,* 266(12):1865–1870

- Hager CL, Larkin EL, Long LA, Ghannoum MA. 2018. Evaluation of the Efficacy of Rezafungin, a Novel Echinocandin, in the Treatment of Disseminated *Candida auris* Infection Using an Immunocompromised Mouse Model. *J Antimicrob Chemother.* 73(8):2085-2088
- Hager CL, Larkin EL, Long L, Abidi FZ, Shaw KJ, Ghannoum MA. 2018. In vitro and in vivo Evaluation of the Antifungal Activity of APX001A/APX001 against *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(3): e02319-17
- Hajioff D, Mackeith S. 2015. Otitis externa. *BMJ Clin Evid.* 2015:0510.
- Holder RC, Kirse DJ, Evans AK, Whigham AS, Peters TR, Poehling KA, Swords WE, Reid SD. 2015. Otopathogens Detected in Middle Ear Fluid Obtained during Tympanostomy Tube Insertion: Contrasting Purulent and Non-Purulent Effusions. *PLOS ONE.* 10(6): e0128606
- Kirkup B. 2013. Culture-Independence for Surveillance and Epidemiology. *Pathogens.* 2(3):556–570
- Kovács R, Tóth Z, Locke JB, Forgács L, Kardos G, Nagy F, Borman AM, Majoros L. 2021. Comparison of In Vitro Killing Activity of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in RPMI-1640 in the Absence and Presence of Human Serum. *Microorganisms.* 9(4):863
- Kreiner-Møller E, Chawes BL, Caye-Thomasen P, Bønnelykke K, Bisgaard H. 2012. Allergic Rhinitis is Associated with Otitis Media with Effusion: a Birth Cohort Study. *Clin Exp Allergy.* 42(11):1615–1620
- Lee HY, Chung JH, Lee SK, Byun JY, Kim YI, Yeo SG. 2013. Toll-like Receptors, Cytokines and Nitric oxide Synthase in Patients with Otitis Media with Effusion. *Indian J Med Res.* 138(4), 523–530
- Lepak AJ, Zhao M, Berkow EL, Lockhart SR, Andes DR. 2017. Pharmacodynamic Optimization for Treatment of Invasive *Candida auris* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(8): e00791-17

- Lieberthal AS, Carroll AE, Chonmaitree T, Ganiats TG, Hoberman A, Jackson MA, Joffe MD, Miller DT, Rosenfeld RM, Sevilla XD, Schwartz RH, Thomas PA, Tunkel DE. 2013. The Diagnosis and Management of Acute Otitis Media. *Pediatrics*. 131(3):964–999
- Liu CM. 2011. The Otologic Microbiome; A Study of the Bacterial Microbiota in a Pediatric Patient With Chronic Serous Otitis Media Using 16SrRNA Gene-Based Pyrosequencing. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 137(7):664-668
- Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender N P, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, Berkow EL, Castanheira M, Magobo RE, Jabeen, K, Asghar RJ, Meis JF, Jackson B, Chiller T, Litvintseva, A. P. 2017. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis*. 64(2):134–140
- Lundgren K, Rundcrantz H. 1976. Microbiology in Serous Otitis Media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 85(2) 152–155
- Luo H, Yang Q, Sheng Y, Wang Z, Zhang Q, Yan J, Hou J, Zhu K, Cheng Y, Wang B, Xu Y, Zhang X, Ren X, Xu M. 2014. Role of Pepsin and Pepsinogen: Linking Laryngopharyngeal Reflux with Otitis Media with Effusion in Children. *Laryngoscope*. 124(7):294-300
- Martinez Devesa P, Willis CM, Capper JW. 2003. External Auditory Canal pH in Chronic Otitis Externa. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 28(4):320–324
- Massa HM, Cripps AW, Lehmann D. 2009. Otitis Media: Viruses, Bacteria, Biofilms and Vaccines. *Med J Aust*. 191(S9):44-49
- Montoya MC, Moye-Rowley WS, Krysan DJ. 2019. *Candida auris*: The Canary in the Mine of Antifungal Drug Resistance. *ACS Infect Dis*. 5(9):1487-1492
- Osei Sekyere J. 2018. *Candida auris*: A Systematic Review and Meta-analysis of Current Updates on an Emerging Multidrug-resistant Pathogen. *Microbiologyopen*. 7(4): e00578
- Palmu A, Puhakka H, Rahko T, Takala AK. 1999. Diagnostic Value of Tympanometry in Infants in Clinical Practice. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 49(3):207–213

- Peyclit L, Yousfi H, Rolain JM, Bittar F. 2021. Drug Repurposing in Medical Mycology: Identification of Compounds as Potential Antifungals to Overcome the Emergence of Multidrug-resistant Fungi. *Pharmaceuticals*. 14(5):488
- Rosenfeld RM, Culpepper L, Doyle KJ, Grundfast KM, Hoberman A, Kenna MA, Lieberthal AS, Mahoney M, Wahl RA, Woods CR, Yawn B. 2004. Clinical Practice Guideline: Otitis Media with Effusion. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 130(5):95-118
- Ryzhov V, Fenselau C. 2001. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. *Anal Chem*. 73(4):746–750
- Sade J. 1966. Pathology and Pathogenesis of Serous Otitis Media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 84(3):297–305
- Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. 2009. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol*. 53(1):41-4. Erratum in: *Microbiol Immunol*. 2018. 62(3):205
- Schaefer P, Baugh RF. 2012. Acute Otitis Externa: An update. *American Family Physician*. 86(11):1055-61
- Shekelle P, Takata G, Chan LS, Mangione-Smith R, Corley PM, Morpew T, Morton S. 2002. Diagnosis, Natural History, and Late Effects of Otitis Media with Effusion. *Evid Rep Technol Assess (Summary)*. 55:1–5
- Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L. 2007. Correlation of Posaconazole Minimum Fungicidal Concentration and Time-kill test Against Nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 60(5):1004-1009
- Suphavitai C, Ko KKK, Lim KM, Tan MG, Boonsimma P, Chu JJK, Goh SS, Rajandran P, Lee LC, Tan KY, Shaik Ismail BB, Aung MK, Yang Y, Sim JXY, Venkatachalam I, Cherng BPZ, Spruijtenburg B, Chan KS, Oon LLE, Tan AL, Tan YE, Wijaya L, Tan BH, Ling ML, Koh TH, Meis JF, Tsui CKM, Nagarajan N. 2024. Detection and characterisation of a sixth *Candida auris* clade in Singapore: a genomic and phenotypic study. *Lancet Microbe*. 12: S2666-5247(24)00101-0

Stool S, Berg A, Berman S, Carney C, Cooley J, Culpepper L, Eavey R, Feagans L, Finitzo T, Friedman E. 1994. Otitis Media with Effusion in Young Children. *AHCPR Clinical Practice Guidelines. No.12.*

Szekely A, Borman AM, Johnson EM. 2019. *Candida auris* Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro. *J Clin Microbiol.* 57(5):e02055-18

Teschner M. 1996. Evidence and Evidence gaps in the Treatment of Eustachian Tube Dysfunction and Otitis Media. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 15:05

Tos M, Bak-Pedersen K. 1972. The Pathogenesis of Chronic Secretory Otitis Media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 95(6):511–521

Tos M, Poulsen G, Borch J. 1979. Etiologic Factors in Secretory Otitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 105(10):582–588

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva. World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wiegand S, Berner R, Schneider A, Lundershausen E, Dietz A. 2019. Otitis Externa: Investigation and Evidence-Based Treatment. *Dtsch Ärztebl Int.* 116(13):224-228

Williamson IG., Dunleavy J, Bain J, Robinson D. 1994. The Natural History of Otitis Media with Effusion - A Three-year Study of the Incidence and Prevalence of Abnormal Tympanograms in four South West Hampshire Infant and First schools. *J. Laryngol. Otol.* 108 (1994) 930–934

10.2. Saját közlemények

lásd: Függelék

11. Tárgyszavak

Candida auris, amphotericin B, ölési ráta, idő-ölés, *in vitro*, krónikus serosus középfülgyulladás, MALDI-TOF MS, bakteriális spektrum

Candida auris, amphotericin B, killing rate, time-kill, *in vitro*, otitis media with effusion, MALDI-TOF MS, bacterial spectrum

12. Köszönetnyilvánítás

Értekezésemet a Debreceni Egyetem Táplálkozás-és Élelmiszertudományi Doktori Iskola hallgatójaként egyéni felkészülés keretei között készítettem. Köszönöm Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, egyetemi tanár, Rektor Úrnak, hogy lehetővé tette a doktori iskolában való részvételemet. Mindenekelőtt külön köszönettel tartozom néhai témavezetőmnek, Dr. Szilvássy Judit Tanárnőnek a publikációk és a disszertáció megírása során nyújtott folyamatos iránymutatásáért, szakmai segítségéért és bátorításáért.

Köszönöm megbízott témavezetőmnek Dr. Majoros László Professor Úrnak a PhD értekezés elkészítése során végzett pótolhatatlan támogatását, valamint a mikrobiológiai vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. A statisztikai feldolgozásban, az ölési görbe és ölési ráta meghatározásában jelentős segítségemre volt Dr. Kovács Renátó László, akinek szintén köszönettel tartozom.

Ugyancsak köszönöm a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet dolgozóinak a MALDI-TOF vizsgálatok kivitelezésében, valamint a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Fül-Orr-Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinikán dolgozó kollégáimnak a biológiai mintavétel során nyújtott segítséget.

Köszönöm a vizsgálatban részt vett összes páciensnek, hogy részvételükkel segítették ennek a munkának a sikerét.

Továbbá köszönöm feleségemnek és fiaimnak, hogy kitartásra ösztönöztek, és barátaimnak, akik bíztattak és szeretetükkel, türelmükkel a kutatások és az értekezés megvalósulását előmozdították.

13. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/413/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Papp Zoltán

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

MTMT azonosító: 10087242

További közlemények

3. Szalmás, A., **Papp, Z.**, Csomor, P., Kónya, J., Sziklai, I., Szekanez, Z., Karosi, T.: Microbiological Profile of Adenoid Hypertrophy Correlates to Clinical Diagnosis in Children.
BioMed Res. Int. 2013, 629607, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/629607>
IF: 2.706
4. Jókay, I., **Papp, Z.**, Lengyel, C. G., Nagy, T., Soós, G., Dezső, B., Sziklai, I.: A magyarországi humán temporális csontbank klinikai jelentősége és feladatai.
Fül-Orr-Gégegyógy. 51 (3), 115-117, 2005.
5. **Papp, Z.**, Rezes, S., Jókay, I., Sziklai, I.: Sensorineural hearing loss in chronic otitis media.
Otol. Neurotol. 24 (2), 141-144, 2003.
IF: 1.073
6. Jókay, I., **Papp, Z.**, Soós, G., Sziklai, I., Dezső, B.: The effect of chronic otitis media on the immunoreactivity of human inner ear.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 258 (10), 529-532, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004050100384>
IF: 0.587
7. **Papp, Z.**, Rezes, S., Jókay, I., Sziklai, I.: Percepciósi nagyothallás kialakulása idült gennyves középfülgyulladásban.
Fül-Orr-Gégegyógy. 46, 99-106, 2000.
8. Jókay, I., **Papp, Z.**, Dezső, B., Soós, G., Répássy, G.: A belsőfüli immunhisztokémiai vizsgálata krónikus középfülgyulladás esetében.
Fül-Orr-Gégegyógy. 43 (4), 244-248, 1997.
9. Jókay, I., Soós, G., **Papp, Z.**, Dezső, B., Répássy, G.: Apoptosis vizsgálata humán belsőfülben.
Fül-Orr-Gégegyógy. 43 (4), 304-309, 1997.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,056

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,69

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján

